

(19)



Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) Veröffentlichungsnummer:

0 393 438
A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 90106624.1

(51) Int. Cl.⁵: C12N 15/12, C12P 21/02,
C07K 13/00, A61K 37/02

(22) Anmeldetag: 08.04.90

(30) Priorität: 21.04.89 DE 3913101
21.06.89 DE 3920282

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
24.10.90 Patentblatt 90/43

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: BOEHRINGER INGELHEIM
INTERNATIONAL G.M.B.H.

D-6507 Ingelheim am Rhein(DE)

(72) Erfinder: Hauptmann, Rudolf, Dr.
Döllachstrasse 22
A-2483 Ebreichsdorf(AT)

Erfinder: Himmeler, Adolf, Dr.
Fürst Liechtensteinstrasse 2/3
A-1238 Wien(AT)

Erfinder: Maurer-Fogy, Ingrid, Dr.
Lindauergasse 35
A-1238 Wien(AT)

Erfinder: Stratowa, Christian, Dr.
Schellinggasse 3/9
A-1010 Wien(AT)

BEST AVAILABLE COPY

Seq ID 1 100% identical. Seq. Fig 1

(54) TNF-Rezeptor, TNF bindende Proteine und dafür kodierende DNAs.

(57) DNA-Sequenzen, kodierend für ein TNF-bindendes Protein und für den TNF-Rezeptor, von dem dieses Protein die lösliche Domäne darstellt. Die DNA-Sequenzen können für die Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle zur Herstellung von TNF-bindendem Protein und TNF-Rezeptor verwendet werden. Rekombinantes TNF-bindendes Protein kommt in pharmazeutischen Zubereitungen zur Behandlung von Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF auftritt, zur Anwendung. Mit Hilfe des TNF-Rezeptors bzw. Fragmenten davon oder mit Hilfe geeigneter Wirtsorganismen, transformiert mit rekombinanten DNA-Molekülen, enthaltend die für den TNF-Rezeptor kodierende DNA oder Fragmente oder Modifikationen davon, können Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit dem TNF-Rezeptor und/oder auf ihre Beeinflussung der biologischen Wirkung von TNF untersucht werden.

EP 0 393 438 A2

TNF-Rezeptor, TNF bindende Proteine und dafür kodierende DNAs

Die Erfindung bezieht sich auf einen TNF-Rezeptor sowie auf ein TNF bindendes Protein.

Tumornekrosefaktor (TNF- α) wurde erstmals im Serum von Mäusen und Kaninchen gefunden, die mit *Bacillus Calmette-Guerin* infiziert und denen Endotoxin injiziert worden war, und auf Grund seiner cytotoxischen und Antitumoreigenschaften erkannt (Carswell et al., 1975). Er wird vor allem von aktivierten Makrophagen und Monozyten produziert. Zahlreiche Zelltypen, die Ziele für TNF sind, weisen Oberflächenrezeptoren mit hoher Affinität für dieses Polypeptid auf (Old et al., 1987); es wurde angenommen, daß Lymphotoxin (TNF- β) an denselben Rezeptor bindet (Aggarwal et al., 1985, Gullberg et al., 1987). TNF- α ist identisch mit einem als Cachectin bezeichneten Faktor (Beutler et al., 1985), der die Lipoproteinlipase unterdrückt und bei chronisch-entzündlichen und malignen Erkrankungen zur Hypertriglyceridämie führt (Tortie et al., 1985, Mahoney et al., 1985). TNF- α dürfte an der Regulation des Wachstums sowie an der Differenzierung und Funktion von Zellen, die bei Entzündungen, Immunvorgängen und Hämatopoese eine Rolle spielen, beteiligt sein.

TNF kann auf den Wirtsorganismus durch Stimulation von Neutrophilen (Shalaby et al., 1985, Klebanoff et al., 1988) und Monocyten sowie durch Hemmung der Replikation von Viren (Mestan et al., 1988, Wong et al., 1988) eine positive Wirkung ausüben. Darüberhinaus aktiviert TNF- α die Immunabwehr gegen Parasiten und wirkt direkt und/oder indirekt als Mediator bei Immunreaktionen, entzündlichen Prozessen und anderen Vorgängen im Organismus, wobei die Wirkmechanismen in vielen Fällen noch ungeklärt sind.

Die Verabreichung von TNF- α (Cerami et al., 1988) kann jedoch auch von schädlichen Erscheinungen (Tracey et al., 1988) wie Schock- und Gewebeschädigungen begleitet sein, die durch Antikörper gegen TNF- α aufgehoben werden können (Tracey et al., 1987). Eine Reihe von Beobachtungen läßt auf eine Rolle von endogen freigesetztem TNF- α bei verschiedenen pathologischen Zuständen schließen. So scheint TNF- α ein Mediator der Kachexie zu sein, die bei chronisch-invasiven, z.B. parasitären Erkrankungen auftreten kann. TNF- α scheint auch eine wesentliche Rolle bei der Pathogenese des durch gram-negative Bakterien verursachten Schocks (Endotoxin-Schock) zu spielen; er dürfte an einigen, wenn nicht allen Wirkungen von Lipopolysacchariden beteiligt sein (Beutler et al., 1988). Ebenso wurde eine Funktion von TNF bei den im Rahmen von entzündlichen Prozessen in Gelenken und anderen Geweben auftretenden Gewebeschädigungen sowie bei der Letalität und Morbidität der Graft-versus-host reaction (GVHR, Transplantat-Abstoßung) (Piguet et al., 1987) postuliert. Auch wurde ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von TNF im Serum und dem tödlichen Ausgang von Meningokokkenkrankungen berichtet (Waage et al., 1987).

Weiters wurde beobachtet, daß die Verabreichung von TNF- α über einen längeren Zeitraum einen Zustand von Anorexie und Auszehrung verursacht, die eine ähnliche Symptomatik aufweist wie die Kachexie, die mit neoplastischen und chronischen infektiösen Erkrankungen einhergeht (Oloff et al., 1987).

Es wurde über eine TNF inhibierende Aktivität eines Proteins aus dem Harn von Fieberpatienten berichtet, von dessen Wirkung vermutet wird, daß sie auf einen kompetitiven Mechanismus auf Rezeptorebene selbst (ähnlich der Wirkung des Interleukin-1 Inhibitors (Seckinger et al., 1987)) zurückzuführen ist (Seckinger et al., 1988).

In der EP-A2 308 378 wird ein TNF inhibierendes Protein beschrieben, das aus menschlichem Harn gewonnen wurde. Seine Wirkung wurde im Harn gesunder und kranker Personen nachgewiesen und aufgrund der Fähigkeit bestimmt, die Bindung von TNF- α an seine Rezeptoren auf humanen HeLa Zellen und FS 11 Fibroblasten sowie die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf murine A9 Zellen zu inhibieren. Das Protein wurde im wesentlichen zur Homogenität gereinigt und durch seinen N-Terminus charakterisiert. In dieser Patentveröffentlichung werden zwar grundsätzlich mögliche Wege dargelegt, zur für das Protein kodierenden DNA und zum rekombinanten Protein zu gelangen; es werden jedoch keine konkreten Angaben gemacht, welcher der theoretisch möglichen Lösungswege zum Ziel führt.

In Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung konnte aus Dialyseharn von Urämiepatienten ebenfalls ein Protein identifiziert werden, das die biologischen Wirkungen von TNF- α hemmt, indem es durch Wechselwirkung mit TNF- α dessen Bindung an seinen Zelloberflächenrezeptor verhindert (Olsson et al., 1988). Von diesem Protein wurde auch eine Affinität zu TNF- β festgestellt.

Die Anwesenheit dieses Proteins (im folgenden TNF-BP genannt) im konzentrierten Dialyseharn wurde durch Konkurrenz mit der Bindung von radioaktiv markiertem rekombinantem TNF- α an einen Subklon von HL-60 Zellen nachgewiesen, wobei der Einfluß von dialysiertem Harn auf die Bindung von 125 I-TNF- α an die Zellen gemessen wurde. Die durchgeführten Bindungsversuche zeigten eine dosisabhängige Hemmung der TNF- α -Bindung an die Zelle durch konzentrierten Dialyseharn (die Möglichkeit der Interpretation, daß die beobachtete Verringerung der Bindung durch gegebenenfalls im Harn vorhandenen TNF- α selbst oder TNF- β , der um die Bindung konkurriert, verursacht werden könnte, wurden durch den Befund, daß die

Verringerung der Bindung durch Anwendung von TNF- α - und TNF- β Antikörpern nicht aufgehoben werden konnte, ausgeschlossen).

In analoger Weise wurde in Vorversuchen zur vorliegenden Erfindung nachgewiesen, daß TNF-BP auch Affinität zu TNF- β aufweist, sie beträgt ca. 1/50 seiner Affinität zu TNF- α .

Mittels Gelchromatographie auf Sephacryl 200 wurde festgestellt, daß eine Substanz im Harn und Serum von Dialysepatienten sowie im Serum von gesunden Personen mit rekombinantem TNF- α einen Komplex mit einem Molekulargewicht von ca. 75 000 bildet.

TNF-BP wurde aus mehreren Proben Dialyseharn von Urämiepatienten durch partielle Reinigung mittels Druckultrafiltration, Ionenaustauschchromatographie und Gelchromatographie 62fach angereichert.

Die erhaltenen Präparationen wurden zum Nachweis der biologischen Aktivität von TNF-BP durch Hemmung der wachstumshemmenden Wirkung von TNF- α auf HL-60-10 Zellen verwendet. Es zeigte sich eine dosisabhängige Wirkung von TNF-BP auf die biologische Wirkung von TNF- α . Es wurde weiters das Bindungsverhalten von Zellen durch Vorbehandlung mit TNF-BP und ausschließendem Kompetitionsbindungstest untersucht. Dabei wurde nachgewiesen, daß Vorbehandlung der Zellen mit TN-BP die Bindung von TNF- α an die Zelle nicht beeinträchtigt. Dies zeigt, daß die Wirkung von TNF-BP nicht auf seiner etwaigen Bindung an die Zelle und Konkurrenzierung mit TNF- α um die Bindung an den Rezeptor beruht.

Das im wesentlichen homogene Protein wurde in hochgereinigter Form erhalten, indem Harn von Dialysepatienten durch Ultrafiltration konzentriert, der konzentrierte Harn dialysiert und zunächst in einem ersten Reinigungsschritt mittels DEAE-Sephacel-Chromatographie auf das Vierfache angereichert wurde. Die weitere Anreicherung erfolgte mittels Affinitätschromatographie durch an Sepharose gebundenen TNF- α . Die Endreinigung wurde mittels Reverse Phase Chromatographie (FPLC) durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß das im wesentlichen hochgereinigte Protein die zytotoxische Wirkung von TNF- α auf WEHI 164 Klon 13 Zellen hemmt (Olsson et al., 1989).

Vom im wesentlichen hochgereinigten Protein wurde die N-terminale Aminosäuresequenz aufgeklärt. Sie wurde mit Asp-Ser-Val-Xaa-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-(Hauptsequenz) bestimmt (daneben wurde in Spuren die folgende N-terminale Sequenz nachgewiesen: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-Xaa-Arg-Glu-(Nebensequenz)). Der Vergleich der Hauptsequenz mit der N-terminalen Sequenz des in der EP-A2 308 378 geoffenbarten TNF inhibierenden Proteins zeigt die Identität der beiden Proteine.

Es wurde folgende Aminosäurezusammensetzung, angegeben in Mol-Aminosäure pro Mol Protein und in Mol % Aminosäure, bestimmt als Mittelwert einer 24- und 48-stündigen Hydrolyse, ermittelt:

	Mol Aminosäure/Mol Protein	Mol % Aminosäure
Asp + Asn	27,5	10,9
Thr	15,8	6,3
Ser	20,7	8,2
Glu + Gln	35,0	13,8
Pro	9,5	3,8
Gly	16,0	6,3
Ala	4,2	1,7
Cys	32,3	12,8
Val	10,8	4,3
Met	1,1	0,4
Ile	7,0	2,8
Leu	20,2	8,0
Tyr	6,1	2,4
Phe	8,1	3,2
His	11,1	4,4
Lys	15,7	6,2
Arg	11,8	4,7
Total	252,9	100

Ein Gehalt an Glukosamin wurde mittels Aminosäureanalyse nachgewiesen. Die Ergebnisse eines mit Concanavalin A und Weizenkeimlektin durchgeführten Affinoblots zeigten ebenfalls, daß es sich bei TNF-BP

um ein Glykoprotein handelt.

Das im wesentlichen homogene Protein wurde tryptisch verdaut und von 17 der erhaltenen Spaltpeptide die Aminosäuresequenzen bestimmt. Weiters wurde der C-Terminus analysiert.

5 TNF-BP kommt offensichtlich die Funktion eines Regulators der TNF-Aktivität mit der Fähigkeit zu, die Konzentrationsänderungen von freiem, biologisch aktivem TNF- α abzupuffern. TNF-BP dürfte auch die Ausscheidung von TNF durch die Niere beeinflussen, weil der mit TNF gebildete Komplex, dessen Molekulargewicht mittels Gelpermeationschromatographie auf Sephadex G 75 mit ca. 75000, bestimmt wurde, im Gegensatz zu TNF offensichtlich nicht durch den Glomerulus zurückgehalten wird.

10 Das TNF-BP wurde aus dem Harn von Dialysepatienten als eine von drei Hauptproteinkomponenten, die Affinität zu TNF aufweisen und die gemeinsam mit TNF-BP von der TNF-Affinitätschromatographiesäule eluieren, nachgewiesen. Die beiden anderen Proteine binden jedoch offensichtlich in einer Weise, die die Bindung von TNF- α an seinen Zelloberflächenrezeptor nicht beeinträchtigt.

Die zur biologischen Wirkung des TNF-BP erhaltenen Ergebnisse, insbesondere der Vergleich der Bindungskonstante mit der für den TNF-Rezeptor beschriebenen Bindungskonstante (Creasey et al., 1987) lieferten einen ersten Hinweis dafür, daß es sich bei diesem Protein um den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors handeln könnte.

20 Auf Grund seiner Fähigkeit, die biologische Wirkung von TNF- α und TNF- β zu inhibieren, ist das TNF bindende Protein geeignet, bei Indikationen eingesetzt zu werden, bei denen eine Herabsetzung der TNF-Aktivität im Organismus angezeigt ist. Geeignet zur Anwendung bei diesen Indikationen sind auch Derivate oder Fragmente des TNF bindenden Proteins mit der Fähigkeit, die biologische Wirkung von TNF zu inhibieren.

TNF-BP (bzw. seine funktionellen Derivate oder aktiven Fragmente) kann zur prophylaktischen und therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt, eingesetzt werden. Zu diesen Erkrankungen zählen insbesondere 25 entzündliche sowie infektiöse und parasitäre Erkrankungen oder Schockzustände, bei denen endogenes TNF- α freigesetzt wird, weiters Kachexie, GVHR, ARDS (Adult Respiratory Distress Symptom) und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, etc. Es sind darunter auch pathologische Zustände zu verstehen, die als Nebenwirkungen bei der Therapie mit TNF- α , besonders bei hoher Dosierung, auftreten können, z.B. schwere Hypotension oder Störungen des Zentralnervensystems.

30 Auf Grund seiner TNF bindenden Eigenschaften ist TNF-BP auch als Diagnostikum für die Bestimmung von TNF- α und/oder TNF- β geeignet, z.B. als eine der Komponenten in Radioimmunoassays oder Enzymimmunoassays, gegebenenfalls zusammen mit Antikörpern gegen TNF.

Auf Grund seiner Eigenschaften ist dieses Protein ein pharmakologisch wertvoller Wirkstoff, der aus natürlichen Quellen nicht in ausreichender Menge mittels proteinchemischer Methoden darstellbar ist.

35 Es bestand daher das Bedürfnis, dieses Protein (bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF zu binden) auf rekombinantem Weg herzustellen, um es für die therapeutische Anwendung in ausreichender Menge zur Verfügung zu stellen.

Unter der "Fähigkeit, TNF zu binden" ist im Rahmen der vorliegenden Erfindung die Eigenschaft eines Proteins zu verstehen, an TNF- α derart zu binden, daß die Bindung von TNF- α an den funktionellen Teil des 40 Rezeptors verhindert und die Wirkung von TNF- α im menschlichen oder tierischen Organismus gehemmt oder aufgehoben wird. Durch diese Definition ist die Fähigkeit eines Proteins, auch an andere Proteine, z.B. an TNF- β , zu binden und deren Wirkung inhibieren zu können, mit eingeschlossen.

Der vorliegenden Erfindung lag die Aufgabe zugrunde, die für TNF-BP kodierende DNA zur Verfügung zu stellen, um auf deren Basis die Herstellung rekombinanter DNA-Moleküle zu ermöglichen, mit denen 45 geeignete Wirtsorganismen transformiert werden können, um TNF-BP bzw. funktionelle Derivate und Fragmente davon zu produzieren.

Im Rahmen dieser Aufgabenstellung sollte auch festgestellt werden, ob es sich beim TNF-BP um den löslichen Teil eines TNF-Rezeptors handelt. Diese Annahme wurde bestätigt, womit die Grundlage für die Aufklärung der Rezeptorsequenz geschaffen war.

50 Eine weitere Aufgabenstellung im Rahmen der vorliegenden Erfindung bestand in der Bereitstellung der für einen TNF-Rezeptor kodierenden cDNA für die Herstellung von rekombinantem humanem TNF-Rezeptor.

Das Vorhandensein eines spezifischen Rezeptors mit hoher Affinität zu TNF- α auf verschiedenen Zelltypen wurde von mehreren Arbeitsgruppen gezeigt. Kürzlich wurde erstmals von der Isolierung und 55 vorläufigen Charakterisierung eines TNF- α Rezeptors berichtet (Stauber et al., 1988). Da die Bindung von radioaktiv markiertem TNF- α durch einen Überschuß TNF- β aufgehoben werden kann (Aggarwal et al., 1985), wurde vorgeschlagen, daß TNF- α und TNF- β einen gemeinsamen Rezeptor teilen. Da jedoch andererseits gezeigt werden konnte, daß bestimmte Zelltypen, die auf TNF- α ansprechen, gegen TNF- α

teilweise oder gänzlich unempfindlich sind (Locksley et al., 1987), wurde die Existenz eines gemeinsamen Rezeptors wieder in Zweifel gezogen.

Im Gegensatz dazu scheinen kürzlich erhaltene Ergebnisse zu den Bindungseigenschaften von TNF- β an Rezeptoren die Theorie eines gemeinsamen Rezeptors wieder zu erhärten (Stäuber et al., 1989), wobei in dieser Arbeit vorgeschlagen wird, daß zwischen TNF- α und TNF- β Unterschiede hinsichtlich der Wechselwirkung mit dem Rezeptor bzw. zusätzlich hinsichtlich der in der Zelle nach der Ligand-Rezeptor-wechselwirkung eintretenden Ereignisse bestehen.

Kürzlich wurde von einem weiteren TNF bindenden Protein berichtet, von dem vermutet wird, daß es sich dabei um die lösliche Form eines anderen TNF-Rezeptors handelt (Engelmann et al., 1990).

Die Verfügbarkeit der für einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA stellt die Voraussetzung für die Herstellung von rekombinantem Rezeptor und damit u.a. eine wesentliche Erleichterung für die Durchführung vergleichender Untersuchungen verschiedener Zelltypen auf ihre(n) TNF- α - und/oder TNF- β -Rezeptor(en) bzw. auf die durch die Bindung von TNF an den Rezeptor in der Zelle ausgelösten Reaktionen dar. Dadurch wird weiters die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors ermöglicht und damit die Voraussetzung für ein rationales Design für die Entwicklung von Agonisten und Antagonisten der TNF-Wirkung geschaffen.

Bei der Lösung der gestellten Aufgabe wurde von der Feststellung ausgegangen, daß das Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken mit Hilfe von Hybridisierungs sonden, die von Aminosäuresequenzen kurzer Peptide abgeleitet sind, auf Grund der Degeneration des genetischen Codes mitunter auf größere Schwierigkeiten stößt. Zusätzlich erschwert wird diese Vorgangsweise dann, wenn von einem Protein, wie z.B. dem TNF-BP, nicht bekannt ist, in welchen Geweben es synthetisiert wird. In diesem Fall kann bei einem Versagen dieser Methode unter Umständen nicht mit Bestimmtheit festgestellt werden, ob es auf die Wahl einer ungeeigneten cDNA-Bibliothek oder auf die zu geringe Spezifität der Hybridisierungs sonden zurückzuführen ist.

Um die für TNF-BP kodierende DNA zu erhalten, wurde daher zunächst erfindungsgemäß wie folgt vorgegangen:

Als cDNA-Bibliothek wurde eine Bibliothek der Fibrosarkomzelllinie HS913 T, die mit TNF α induziert worden war und in λ gt11 vorlag, eingesetzt. Um aus dieser Bibliothek λ DNA mit TNF-BP Sequenzen zu erhalten, wurde die große Empfindlichkeit der Polymerase Kettenreaktion (PCR, (Saiki, 1988)) ausgenutzt. (Mit Hilfe dieser Methode kann aus einer gesamten cDNA-Bibliothek eine unbekannte DNA-Sequenz erhalten werden, die flankiert ist von Oligonukleotiden, die auf Basis bekannter Aminosäureteilsequenzen entworfen und als Primer eingesetzt wurden. Ein solches längeres DNA-Fragment kann nachfolgend als Hybridisierungs sonde, z.B. zur Isolierung von cDNA-Klonen, insbesondere des ursprünglichen cDNA-Klons, eingesetzt werden).

Auf Basis der N-terminalen Aminosäuresequenz (Hauptsequenz) und Aminosäuresequenzen von tryptischen Peptiden, die vom hochgereinigten TNF-BP erhalten worden waren, wurden Hybridisierungs sonden hergestellt. Mit Hilfe dieser Sonden wurde mittels PCR aus der cDNA-Bibliothek HS913T eine cDNA, die einen Teil der für TNF-BP kodierenden cDNA darstellt, erhalten. Diese cDNA weist die folgende Nukleotidsequenz auf:

CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA
ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG
AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG

Diese DNA stellt eine von möglichen Varianten dar, die geeignet sind, mit TNF-BP-DNAs bzw. TNF-BP-RNAs zu hybridisieren (solche Varianten umfassen z.B. diejenigen DNA-Moleküle, die durch PCR-Amplifikation mit Hilfe von Primern erhalten werden, deren Nukleotidsequenz nicht exakt mit der gesuchten Sequenz übereinstimmt, etwa aufgrund von zu Klonierungszwecken vorgesehenen Restriktionsschnittstellen oder aufgrund von bei der Aminosäuresequenzanalyse etwa nicht eindeutig ermittelten Aminosäuren). Unter "TNF-BP-DNAs" bzw. "TNF-BP-RNAs" sind Nukleinsäuren zu verstehen, die für TNF-BP bzw. verwandte Proteine mit der Fähigkeit, TNF zu binden kodieren bzw. die für ein solches Protein kodierende Sequenz enthalten.

Unter TNF-BP-DNAs (bzw. TNF-BP-RNAs) sind auch cDNAs, abgeleitet von mRNAs, die durch alternatives Splicing entstanden sind (bzw. diese mRNAs selbst), mitumfaßt. Unter "alternativem Splicing" wird die Entfernung von Introns verstanden, bei der vom gleichen mRNA-Precursor verschiedene Spliceacceptor- und/oder Splicedonorstellen verwendet werden. Die dabei entstehenden mRNAs unterscheiden sich voneinander durch das gänzliche oder teilweise Vorhandensein oder Fehlen von bestimmten Exonsequenzen, wobei es gegebenenfalls zu einer Verschiebung des Leserasters kommen kann.

Die erfindungsgemäß zunächst erhaltene, einen Teil der für TNF-BP kodierenden Sequenz enthaltende cDNA (bzw. Varianten davon) kann somit als Hybridisierungs sonde verwendet werden, um aus cDNA-

Bibliotheken cDNA-Klone, enthaltend TNF-BP-DNAs, zu erhalten. Weiters kann sie als Hybridisierungssonde für mRNA-Präparationen eingesetzt werden, um TNF-BP-RNAs zu isolieren und daraus z.B. angereicherte cDNA-Bibliotheken herzustellen, die ein wesentlich vereinfachtes und effizienteres Screening ermöglichen. Ein weiteres Anwendungsgebiet ist die Isolierung der gewünschten DNAs aus genomischen DNA-Bibliotheken mit Hilfe dieser DNAs als Hybridisierungssonden.

Die oben definierte DNA (bzw. ihre Varianten) ist in der Lage, mit DNAs (bzw. RNAs) zu hybridisieren, die für TNF-BP kodieren bzw. die für TNF-BP kodierende Sequenz enthalten. Mit Hilfe dieser DNA als Sonde können auch cDNAs erhalten werden, die für Proteine kodieren, deren Prozessierung TNF-BP ergibt. Unter Prozessierung ist die in vivo Abspaltung von Teilsequenzen zu verstehen. Dabei kann es sich N-terminal um die Signalsequenz und/oder andere Sequenzen und gegebenenfalls zusätzlich C-terminal um die transmembrane und zytoplasmatische Region des Rezeptors handeln. Mit Hilfe dieser Hybridisierungssonde ist es daher möglich, geeignete cDNA-Bibliotheken auf das Vorhandensein von cDNA, die die vollständige für einen TNF-Rezeptor kodierende Sequenz enthält, zu durchsuchen (dieser Vorgang kann erforderlichenfalls in mehreren Schritten erfolgen).

Erfindungsgemäß wurde die cDNA der oben definierten Sequenz, die mittels PCR aus der cDNA-Bibliothek der TNF- α induzierten Fibrosarkomzelllinie HS913 T (in λ gt11) erhalten worden war, zum nochmaligen Durchsuchen der cDNA-Bibliothek verwendet, von den hybridisierenden Klonen die Lambda-DNA präpariert, subkloniert und sequenziert. Es wurde ein 1334 Basen langes cDNA Insert erhalten, das die für TNF-BP kodierende Sequenz enthält.

Es wurden somit zunächst DNAs, kodierend für ein Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden, bzw. für ein Polypeptid, von dem dieses TNF bindende Protein eine Teilsequenz darstellt, bereitgestellt. Darunter sind auch solche DNAs zu verstehen, die für Teile dieser Polypeptide kodieren.

Die vollständige Nukleotidsequenz des längsten erhaltenen cDNA-Inserts ist in Fig.1 abgebildet.

Diese Nukleotidsequenz weist einen durchgehenden offenen Leserahmen auf, beginnend mit Base 213, bis zum Ende des 1334 bp. langen cDNA Inserts. Da sich in demselben Leserahmen 4 Codons vor dem potentiellen Translationsstartcodon ATG (213-215) ein Stopcodon (TAG) befindet, wurde davon ausgegangen, daß es sich bei dem Startcodon tatsächlich um den in vivo verwendeten Translationsstart handelt.

Der Vergleich der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz mit den Aminosäuresequenzen, die vom aminoterminalen Ende von TNF-BP und von tryptischen Peptiden bestimmt worden waren, zeigt hohe Übereinstimmung. Daraus ergibt sich, daß die isolierte cDNA die für das authentische TNF-BP kodierende Sequenz enthält.

Vom N-Terminus ausgehend ist die erste Sequenz, die eine Übereinstimmung mit einer tryptischen Spaltpeptidsequenz zeigt, die Sequenz von Fraktion 12 (Leu-Val-Pro...), die auch als Nebensequenz bei der Analyse des N-Terminus von TNF-BP erhalten worden war. Dieses N-terminale Leucin entspricht der 30. Aminosäure in der cDNA Sequenz. Da der vorangehende Abschnitt von 29 Aminosäuren einen stark hydrophoben Charakter aufweist und es sich bei TNF-BP um ein sekretiertes Protein handelt, kann gefolgert werden, daß diese 29 Aminosäuren das für den Sekretionsvorgang benötigte Signalpeptid darstellen, das bei der Sekretion abgespalten wird (in Figur 1 mit S1-S29 bezeichnet). Die als Hauptsequenz bei der N-terminalen Analyse von TNF-BP erhaltene Aminosäuresequenz entspricht den Aminosäuren beginnend mit Asp-12 in der cDNA Sequenz. Dieser Asparaginsäurerest folgt direkt dem basischen Dipeptid Lys-Arg. Da nach diesem Dipeptid in vivo sehr viele Proteine proteolytisch gespalten werden, ist anzunehmen, daß TNF-BP mit N-terminalem Asp nicht direkt durch Prozessierung eines Precursors beim Sekretionsvorgang entsteht, sondern daß vom prozessierten Protein die N-terminalen 11 Aminosäuren zu einem späteren Zeitpunkt durch extrazelluläre Proteasen abgespalten werden. Das carboxy-terminale Ende von TNF-BP war mit Ile-Glu-Asn bestimmt worden (C-terminale Analyse; tryptisches Peptid Fraktion 27; Aminosäuren 159-172, tryptisches Peptid Fraktion 21; Aminosäuren 165-172), wobei Asn der Position 172 in der cDNA Sequenz entspricht.

Potentielle N-Glykosylierungsstellen der allgemeinen Formel Asn-Xaa-Ser/Thr, wobei Xaa jede beliebige Aminosäure außer Prolin sein kann, befinden sich an den Positionen 25-27 (Asn-Asn-Ser), 116-118 (Asn-Cys-Ser) und 122-124 (Asn-Gly-Thr) der TNF-BP cDNA Sequenz. (Daß Asn-25 glykosyliert ist, ergibt sich daraus, daß bei der Sequenzierung des entsprechenden tryptischen Spaltpeptids an dieser Stelle Asn nicht identifiziert werden konnte.)

Die Analyse der Nukleotid- bzw. der davon abgeleiteten Aminosäuresequenz im Zusammenhang mit den durchgeführten proteinchemischen Untersuchungen zeigt, daß es sich bei TNF-BP um ein glykosyliertes Polypeptid mit 172 Aminosäuren, das durch proteolytische Spaltung nach der 11. Aminosäure in ein Glykoprotein mit 161 Aminosäuren umgewandelt wird, handelt.

Die nachfolgende Tabelle zeigt die sequenzierten tryptischen Peptide und die aus der cDNA Sequenz abgeleiteten korrespondierenden Aminosäuresequenzen:

Erktion	Aminosäuren.	
12	1-8	
1	12-19	
8	20-32	
14/I	38-48	
20	38-53	
11	54-67	
14/II	79-81	
28	133-148	
5	147-158	
27	159-172	

(Aminosäuren 68-67 waren am Peptid nicht korrekt bestimmt worden)

15

Die erhaltene cDNA stellt die Voraussetzung für die Herstellung von rekombinantem TNF-BP dar.

Die zunächst erfindungsgemäß isolierte cDNA enthält, wie bereits erwähnt, nach dem Codon für Asn-172 nicht das Stopcodon, das aufgrund der Analyse des C-Terminus zu erwarten wäre, sondern der offene Leserahmen wird fortgesetzt. Die Region zwischen Val-183 und Met-204 hat einen stark hydrophoben Charakter. Dieser hydrophobe Bereich von 22 Aminosäuren, gefolgt von einem Abschnitt mit einem Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren (Arg-206, Arg-209) weist die typischen Merkmale einer Transmembrandomäne auf, die Proteine in der Zellmembran verankert. Der in Richtung C-Terminus folgende Proteinanteil ist dagegen wieder stark hydrophil.

Das Hydrophobizitätsprofil ist in Fig.2 abgebildet (der Hydrophobizitätsplot wurde mit Hilfe des Mac Molly Programms (Fa.Soft Gene Berlin) erstellt; die Fensterweite für die Berechnung der Werte betrug 11 Aminosäuren. Hydrophobe Bereiche entsprechen positiven, hydrophile Bereiche negativen Werten auf der Ordinate. Auf der Abszisse ist die Zahl der Aminosäuren, beginnend mit dem Startmethionin S1, dargestellt).

Aus der Proteinstruktur ergibt sich, daß die für das lösliche, sekretierte TNF-BP kodierende DNA Teil einer für ein größeres Protein kodierenden DNA ist: Dieses Protein weist die Merkmale eines in der Zellmembran verankerten Proteins auf, enthält TNF-BP in für eine extrazelluläre Domäne typische Weise und weist einen beträchtlichen für zytoplasmatische Domänen typischen Abschnitt auf. Lösliches TNF-BP wird offensichtlich von dieser membrangebundenen Form durch proteolytische Spaltung knapp außerhalb der Transmembrandomäne erhalten.

Die Struktur des von der erhaltenen cDNA-kodierten Proteins im Zusammenhang mit der Fähigkeit von TNF-BP, TNF zu binden, bestätigen die Annahme, daß es sich bei TNF-BP um einen Teil eines zellulären Oberflächenrezeptors für TNF handelt, dessen extrazelluläre, für die Bindung von TNF verantwortliche Domäne proteolytisch abgespalten werden kann und in Form des löslichen TNF-BP wiedergefunden wird. (Dabei soll nicht ausgeschlossen werden, daß im Hinblick auf die Funktionsfähigkeit des Rezeptors dieses Protein gegebenenfalls mit einem oder mehreren anderen Proteinen assoziiert ist).

Für Zwecke der Produktion von TNF-BP in größerem Maßstab wird vorteilhafterweise nicht von der gesamten cDNA ausgegangen, weil das Erfordernis der Abspaltung von TNF-BP von dem Teil des Proteins, das den membrangebundenen Teil des TNF-Rezeptors darstellt, berücksichtigt werden müßte. Es wird vielmehr, wie bereits angeführt, zweckmäßigerweise nach dem Codon für Asn-172 durch gerichtete Mutagenese ein Translationsstopcodon eingeführt, um eine über das C-terminale Ende von TNF-BP hinausgehende Proteinsynthese zu verhindern.

Mit der zunächst erfindungsgemäß erhaltenen cDNA, die eine Teilsequenz der für einen TNF-Rezeptor kodierenden DNA darstellt, kann man zur vollständigen Rezeptorsequenz gelangen, indem man z.B. mittels modifizierter PCR (RACE = "rapid amplification of cDNA ends" (Frohman et al., 1988)) das fehlende 3'-Ende mit Hilfe eines Primers, der aufgrund einer möglichst weit in Richtung 3'-Ende der vorhandenen cDNA gelegenen Sequenz konstruiert wurde, amplifiziert. Eine alternative Methode besteht im konventionellen Screenen der cDNA-Bibliothek mit der verfügbaren cDNA bzw. Teilen davon als Sonde.

Erfindungsgemäß wurde zunächst die Ratten-TNF-Rezeptor cDNA isoliert mit einer Teilsequenz daraus die vollständige humane TNF-Rezeptor cDNA erhalten und zur Expression gebracht.

Gegenstand der Erfindung ist ein humaner TNF-Rezeptor sowie die dafür kodierende DNA. Unter diese Definition fallen auch DNAs, die für C- und/oder N-terminal verkürzte, z.B. prozessierte, oder für modifizierte (z.B. durch Änderungen an proteolytischen Spaltstellen, Glykosylierungsstellen oder bestimmten Domänenbereichen) Formen bzw. für Fragmente, z.B. die verschiedenen Domänen, des TNF-Rezeptors kodieren. Diese DNAs können in Verbindung mit den für die Expression erforderlichen Kontrollsequenzen als

Bestandteil rekombinanter DNA-Moleküle, die ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, zur Transformation von prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen verwendet werden. Dadurch wird einerseits die Voraussetzung geschaffen, den TNF-Rezeptor bzw. Modifikationen oder Fragmente davon in größeren Mengen auf rekombinantem Weg herzustellen, um z.B. die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Rezeptors zu ermöglichen. Andererseits können mit diesen DNAs höhere eukaryotische Zellen transformiert werden, um Studien über Mechanismen und Dynamik der TNF/Rezeptor-Wechselwirkung, der Signalübertragung bzw. über die diesbezügliche Relevanz der verschiedenen Rezeptordomänen bzw. Abschnitten davon zu erhalten.

Der rekombinante TNF-Rezeptor (bzw. Fragmente oder Modifikationen davon) kann dazu verwendet werden, Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit TNF oder dem TNF-Rezeptor bzw. auf ihren Einfluß auf die durch TNF induzierte Signalübertragung zu untersuchen. Derartige Screenings (unter Verwendung von Proteinon/Fragmenten bzw. von entsprechend transformierten höheren eukaryotischen Zellen) schaffen die Voraussetzung für die Identifizierung von Substanzen, die TNF substituieren, seine Bindung an den Rezeptor hemmen bzw. solche, die den Mechanismus der durch TNF ausgelösten Signalübertragung blockieren oder verstärken können.

Eine Möglichkeit für das Auffinden von Agonisten und Antagonisten von TNF bzw. dem TNF-Rezeptor besteht in der Etablierung eines High Capacity Screening. Dabei wird eine geeignete Zelllinie, vorzugsweise eine solche, die keinen endogenen humanen TNF-Rezeptor exprimiert, mit einem Vektor transformiert, der die für einen funktionellen TNF-Rezeptor kodierende, gegenüber der natürlichen Sequenz gegebenenfalls modifizierte, DNA enthält. Die Wirkung von Agonisten bzw. Antagonisten kann in einem derartigen Screening untersucht werden, indem die Antwort auf die Wechselwirkung der Substanz mit dem Rezeptor über einen geeigneten Reporter (veränderte Enzymaktivität, z.B. Proteinkinase C, oder Genaktivierung, z.B. Mangan-Superoxiddismutase, NF- κ B) verfolgt wird.

Untersuchungen über Mechanismen und Dynamik der TNF/Rezeptor-Wechselwirkung, der Signalübertragung bzw. die diesbezügliche Rolle der Rezeptordomänen können z.B. auch durchgeführt werden, indem DNA-Abschnitte, kodierend für die extrazelluläre Domäne des TNF-Rezeptors (bzw. Teile davon) mit DNA-Abschnitten, kodierend für verschiedene Transmembrandomänen und/oder verschiedene zytoplasmatische Domänen kombiniert und in eukaryotischen Zellen zur Expression gebracht werden. Die dabei erhältlichen hybriden Expressionsprodukte können geeignet sein, aufgrund gegebenenfalls veränderter Eigenschaften für die Signaltransduktion Aufschluß über die diesbezügliche Relevanz der verschiedenen Rezeptordomänen zu geben, womit ein gezieltes Screening erleichtert wird.

Die Verfügbarkeit der für den TNF-Rezeptor kodierenden cDNA bzw. Abschnitten davon stellt die Voraussetzung dar, zur genomischen DNA zu gelangen. Dazu wird unter stringenten Bedingungen eine DNA-Bibliothek gescreent und die erhaltenen Klone darauf untersucht, ob sie zusätzlich zu den kodierenden Regionen die für die Genexpression erforderlichen regulatorischen Sequenzelemente aufweisen (z.B. Überprüfung auf Promotorfunktion durch Fusion mit kodierenden Regionen geeigneter Reportergene). Der Erhalt der genomischen DNA-Sequenz bietet die Möglichkeit, die im nicht für den TNF-Rezeptor kodierenden Bereich, insbesondere in der 5'-flankierenden Region, gelegenen regulatorischen Sequenzen auf eine etwaige Wechselwirkung mit bekannten, die Genexpression modulierenden Substanzen, z.B. Transkriptionsfaktoren, Steroide, zu untersuchen bzw. gegebenenfalls neue Substanzen, die möglicherweise für die Expression dieses Gens spezifische Wirkung haben, aufzufinden. Die Ergebnisse solcher Untersuchungen bieten die Grundlage für den gezielten Einsatz derartiger Substanzen für die Modulation der TNF-Rezeptor-Expression und damit für eine direkte Beeinflussung der Fähigkeit der Zelle zur Interaktion mit TNF. Damit können die spezifische Reaktion mit dem Liganden und die daraus resultierenden Wirkungen unterbunden werden.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind auch DNAs mitumfaßt, die für Subtypen des TNF-Rezeptors bzw. seiner löslichen Formen kodieren, welche gegebenenfalls unterschiedliche Eigenschaften gegenüber dem vorliegenden TNF-Rezeptor aufweisen. Dabei handelt es sich um Expressionsprodukte, die aufgrund von alternativem Splicing entstanden sind und geänderte Strukturen in Teilbereichen aufweisen, z.B. Strukturen, die eine Veränderung der Affinität und Spezifität für den Liganden (TNF- α /TNF- β) oder eine Veränderung hinsichtlich Art und Effizienz der Signalübertragung bewirken können.

Mit Hilfe der für den TNF-Rezeptor kodierenden cDNA können Nukleinsäuren erhalten werden, die mit der cDNA oder Abschnitten davon unter Bedingungen niedriger Stringenz hybridisieren und für ein Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden, kodieren oder die für ein solches Polypeptid kodierende Sequenz enthalten.

Gegenstand der Erfindung ist in einem weiteren Aspekt das rekombinante TNF-BP, vorzugsweise in sekretierbarer Form, das den löslichen Teil des erfindungsgemäßen TNF-Rezeptors darstellt sowie die dafür kodierende DNA.

Durch Einbringen eines DNA-Konstruktes, enthaltend die für TNF- β kodierende Sequenz mit einer für ein Signalpeptid kodierenden Sequenz unter Kontrolle eines geeigneten Promoters in geeignete Wirtsorganismen, zweckmäßigerweise in eukaryotische, bevorzugt höhere eukaryotische Zellen, kann TNF-BP produziert werden, das in den Zellüberstand sekretiert wird.

Im Falle der Verwendung eines Signalpeptids im Hinblick auf die Sekretion des Proteins wird zweckmäßigerweise die für das Signalpeptid kodierende DNA vor das Codon für Asp-12 gefügt, um ein einheitliches Produkt zu erhalten. Grundsätzlich ist jedes Signalpeptid geeignet, das im entsprechenden Wirtsorganismus die Sekretion des reifen Proteins gewährleistet. Gegebenenfalls kann die Signalsequenz auch vor das für Leu-1 kodierende Triplet gesetzt werden, wobei in diesem Fall erforderlich sein kann, die durch Abspaltung des aus 11 Aminosäuren bestehenden Peptids am N-Terminus entstehende Form von TNF-BP vom nicht oder nicht vollständig prozessierten TNF-BP in einem zusätzlichen Reinigungsschritt zu trennen.

Da die cDNA nach dem Codon für Asn-172, das aufgrund der C-terminalen Analyse den C-Terminus darstellt, kein Stopcodon enthält, wird zweckmäßigerweise im Hinblick auf die Expression von TNF-BP nach dem Codon für Asn 172 durch gerichtete Mutagenese ein Translationsstopcodon eingeführt.

Die für TNF-BP kodierende DNA kann durch Mutation, Transposition, Deletion, Addition oder Verkürzung modifiziert werden, sofern derartig modifizierte DNAs für (Poly)peptide mit der Fähigkeit, TNF zu binden, kodieren. Derartige Modifikationen können z.B. darin bestehen, eine oder mehrere der potentiellen, gegebenenfalls für die biologische Aktivität nicht erforderlichen Glykosylierungsstellen zu verändern, indem z.B. das Asn-Codon durch ein für eine andere Aminosäure kodierendes Triplet ersetzt wird. Unter Berücksichtigung der Erhaltung der biologischen Aktivität können auch Modifikationen vorgenommen werden, die in einer Änderung der Disulfidbrücken (z.B. Verringerung deren Anzahl) resultieren.

Die angeführten DNA-Moleküle stellen somit die Voraussetzung für die Konstruktion rekombinanter DNA-Moleküle dar, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind. Mit solchen rekombinanten DNA-Molekülen in Form von Expressionsvektoren, enthaltend die für ein Protein mit TNF-BP Aktivität kodierende, gegebenenfalls in geeigneter Weise modifizierte DNA, vorzugsweise mit einer vorgeschalteten Signalsequenz, und die für die Expression des Proteins erforderlichen Kontrollsequenzen, können geeignete Wirtsorganismen transformiert, gezüchtet und das Protein gewonnen werden.

Ebenso wie etwaige Modifikationen der DNA-Sequenz erfolgt die Auswahl von für die Expression geeigneten Wirtsorganismen insbesondere im Hinblick auf die biologische Wirkung des Proteins, TNF zu binden. Darüberhinaus gehen die bei der Herstellung rekombinanter Proteine üblichen Kriterien wie Verträglichkeit mit dem gewählten Vektor, Prozessierungsfähigkeit, Isolierung des Proteins, Expressionscharakteristika, Sicherheits- und Kostenaspekte in die Entscheidung über den Wirtsorganismus ein. Die Wahl eines geeigneten Vektors ergibt sich aus dem für die Transformation vorgesehenen Wirt. Grundsätzlich sind alle Vektoren geeignet, die die erfindungsgemäßen für TNF-BP kodierenden DNAs (bzw. Modifikationen davon) replizieren und exprimieren.

Im Hinblick auf die biologische Aktivität des Proteins ist bei der Expression der für TNF-BP kodierenden DNA vor allem der etwaigen Relevanz der beim natürlichen Protein festgestellten Kriterien Glykosylierung und hoher Anteil an Cysteinresten für die Eigenschaft, TNF zu binden, Rechnung zu tragen. Zweckmäßig werden daher für die Expression Eukaryonten, insbesondere geeignete Expressionssysteme höherer Eukaryonten, verwendet.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden sowohl transiente als auch permanente Expression von TNF-BP in eukaryotischen Zellen nachgewiesen.

Das erfindungsgemäße rekombinante TNF-B ebenso wie geeignete Modifikationen davon, die die Fähigkeit aufweisen, TNF zu binden, können bei der prophylaktischen und therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers bei Indikationen eingesetzt werden, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α auftritt.

Da beim TNF-BP auch eine TNF- β inhibierende Wirkung nachgewiesen wurde, kann es (bzw. die verwandten bzw. modifizierten Polypeptide) in geeigneter Dosierung, gegebenenfalls in im Hinblick auf eine gesteigerte Affinität zu TNF- β modifizierter Form, auch für die Inhibierung der Wirkung von TNF- β im Organismus verwendet werden.

Gegenstand der Erfindung sind daher weiters pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend eine die biologische Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β wirksam hemmende Menge von rekombinantem TNF-BP bzw. einem verwandten Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden.

Pharmazeutische Zubereitungen kommen insbesondere für die parenterale Anwendung bei den erwähnten Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF auftritt, in Betracht, z.B. in Form von Lyophilisaten oder Lösungen. Diese enthalten TNF-BP oder ein therapeutisch wirksames funktionelles Derivat in therapeutisch wirksamer Menge, gegebenenfalls zusammen mit physiologisch verträglichen

Zusatzstoffen, wie Stabilisatoren, Puffern, Konservierungsmitteln, etc.

Die Dosierung hängt vor allem von der jeweiligen Indikation und der spezifischen Verabreichungsform, z.B. ob sie lokal oder systemisch erfolgt, ab. Die Größe der Einzeldosen erfolgt gegebenenfalls an Hand der individuellen Beurteilung des Krankheitsfalles unter Einbeziehung von Faktoren wie Allgemeinzustand, Anamnese, Alter, Gewicht, Geschlecht des Patienten, etc. Wesentlich für die Bestimmung der therapeutisch wirksamen Dosis ist die Berücksichtigung der für die Erkrankung verantwortlichen Menge an ausgeschüttetem TNF sowie die Menge an endogenem TNF-BP. Grundsätzlich kann davon ausgegangen werden, daß zur wirksamen Behandlung einer durch TNF ausgelösten Erkrankung für die ausgeschüttete Menge TNF mindestens dieselbe molare Menge an TNF-BP, gegebenenfalls eine mehrfache Überschuß erforderlich ist.

Im einzelnen wurde die gestellte Aufgabe wie folgt gelöst:

Vom hochgereinigten TNF-BP wurden die N-terminale Aminosäuresequenz sowie die Aminosäuresequenzen von durch tryptischen Verdau des Proteins erhaltenen Peptiden bestimmt.

Weiters wurde der C-Terminus durch Carboxypeptidase P Verdau, Derivatisierung der abgespaltenen Aminosäuren und chromatographische Auftrennung bestimmt.

Aus den durch tryptischen Verdau erhaltenen Peptidsequenzen wurden im Hinblick auf ihren Einsatz in der PCR für die Herstellung von Oligonukleotiden Bereiche einerseits aus dem N-Terminus und andererseits aus einem tryptischen Peptid derart ausgewählt, daß die Komplexität von Mischoligonukleotiden für die Hybridisierung mit cDNA möglichst gering ist. Auf Basis dieser beiden Bereiche wurde je ein Satz Mischoligonukleotide hergestellt, wobei der vom N-terminal gelegenen Bereich abgeleitete entsprechend der mRNA und der vom tryptischen Peptid abgeleitete revers komplementär zur mRNA synthetisiert wurde. Um das nachfolgende Klonieren eines mit PCR amplifizierten Segments zu erleichtern, wurde der vom tryptischen Peptid abgeleitete Satz von Oligonukleotiden mit einer BamHI-Restriktionsstelle versehen. Darauf wurde λ DNA aus der TNF- α induzierten Fibrosarkom cDNA-Bibliothek isoliert und daraus eine TNF-BP-Sequenz mittels PCR amplifiziert. Das erhaltene Fragment wurde kloniert und sequenziert; es weist 158 Nukleotide auf und enthält zwischen den beiden von den Primer Oligonukleotiden stammenden Sequenzabschnitten die für das tryptische Peptid 20 kodierende Sequenz.

Dieses DNA-Fragment wurde nachfolgend radioaktiv markiert und als Sonde zur Isolierung von cDNA-Klonen aus der Fibrosarkom-Bibliothek verwendet. Es wurde dazu so verfahren, daß zunächst Plaques mit der Sonde hybridisiert, Phagen von hybridisierenden Plaques vereinzelt und daraus λ DNA gewonnen wurden. Einzelne cDNA-Klone wurden subkloniert und sequenziert; zwei der charakterisierten Klone enthielten die für TNF-BP kodierende Sequenz.

Diese Sequenz stellt einen Teil der für einen TNF-Rezeptor kodierenden Sequenz dar.

Nach Verkürzen der 5'-nicht kodierenden Region und Einführen eines Stop-Codons nach dem Codon für die C-terminale Aminosäure des natürlichen TNF-BP wurde die cDNA in ein geeignetes Expressionsplasmid inseriert, damit eukaryotische Zellen transformiert und die Expression von TNF-BP mittels ELISA nachgewiesen.

Die noch ausstehende 3'-Region des TNF-Rezeptors wurde erhalten, indem eine Rattenhirn cDNA-Bibliothek aus der Ratten Glia Tumorzelllinie C6 mit einer TNF-BP Sonde durchsucht und die vollständige für den Ratten-TNF-Rezeptor kodierende cDNA isoliert wurde.

Der 3' gelegene Abschnitt dieser cDNA, von dem angenommen wurde, daß er der fehlenden 3'-Region hinter der EcoRI Schnittstelle des humanen TNF-Rezeptors entspricht, wurde als Sonde zum nochmaligen Durchsuchen der HS913T cDNA-Bibliothek verwendet. Dabei wurde ein Klon erhalten, der die gesamte für den TNF-Rezeptor kodierende DNA enthält.

Nach Verkürzen der 5'-nicht kodierenden Region wurde die cDNA in ein Expressionsplasmid inseriert und die Expression von humanem TNF-Rezeptor in eukaryotischen Zellen über die Bindung von radioaktiv markiertem TNF nachgewiesen.

Mittels Northern Blot-Analyse wurde bestätigt, daß die isolierte cDNA nahezu der gesamten TNF-R mRNA entspricht (die geringfügige Diskrepanz ergibt sich aus dem Fehlen eines Teils der 5'-nichtkodierenden Region). Daraus kann gefolgert werden, daß es sich beim exprimierten Protein um den vollständigen TNF-Rezeptor handelt.

Die Erfindung wird an Hand der folgenden Vorversuche und Beispiele illustriert.

Vorversuch 1

Herstellung von hochgereinigtem TNF-BP

a) Konzentration des Harns

200 l Dialyseharn von Urämiepatienten, aufbewahrt in Flaschen enthaltend EDTA (10 g/l), Tris (8 g/l), NaN_3 (1 g/l) und Benzamidinhydrochlorid (1 g/l) sowie kühl gelagert, wurden durch Ultrafiltration mittels einem hochdurchlässigen Hämokapillarfilter mit einer asymmetrischen Hohlfasermembran (FH 88H, Gam-bro) auf 4,2 l mit einem Proteingehalt von 567 g konzentriert. Der konzentrierte Harn wurde gegen 10mM/l Tris HCl, pH 8 dialysiert. Während dieses Vorgangs wurde, wie in den nachfolgenden Schritten (außer bei der Reverse Phase Chromatographie), 1mM/l Benzamidinhydrochlorid zugefügt, um proteolytischem Verdau entgegenzuwirken. Alle nachfolgenden Reinigungsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, bei 4 °C durchgeführt.

b) Ionenaustauschchromatographie

Dieser Schritt wurde durchgeführt, indem DEAE-Sephacel-Säulen (2,5 x 40 cm) mit Proben konzentrierten und dialysierten Harns, enthaltend je ca. 75 g Protein, beschickt wurden. Eluiert wurde mit 800 ml eines NaCl /10mM Tris/HCl pH-8-Gradienten, wobei die NaCl Konzentration 0 bis 0,4 M betrug. Die das TNF-BP enthaltenden Fraktionen von sieben Säulen mit einem Gesamtproteingehalt von 114 g wurden bei -20 °C

c) Affinitätschromatographie

Zur Herstellung der TNF-Sepharosensäule wurde rTNF- α (15 mg) in 0,1 M NaHCO_3 , 1 M NaCl, pH 9 (Kopplungspuffer) an 1,5 g cyanogenbromidaktivierte Sepharose 4B (Pharmacia) gekoppelt. Die Sepharose wurde in 1mM HCl gequollen und mit Kopplungspuffer gewaschen. Nach Zusatz von rTNF- α wurde die Suspension 2 Stunden lang bei Raumtemperatur rotieren gelassen. Der Überschuß an CNBr-Gruppen wurde durch eineinhalbstündige Rotation mit 1M Ethanolamin, pH 8 blockiert. Die TNF-Sepharese wurde einige Male abwechselnd in 1M NaCl, 0,1 M Natriumacetat pH 8 und 1 M NaCl, 0,1 M Borsäure pH 4 gewaschen und anschließend in phosphatgepufferter Kochsalzlösung mit 1mM Benzamidinhydrochlorid gelagert. Die aus Schritt b) erhaltenen Fraktionen wurden auf eine Konzentration von 0,2 M NaCl, 10mM Tris/HCl, pH 8 eingestellt. Die TNF-Sepharese wurde in eine Säule gepackt und mit 0,2 M NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8 gewaschen und die TNF-BP enthaltenden Fraktionen, entsprechend ca. 30 g Protein, bei einer Durchflußrate von 10 ml/h aufgetragen und ausgiebig mit 0,2 M NaCl, 10mM Tris HCl, pH 8 gewaschen, bis im Eluat bei 280nm keine Absorption mehr nachweisbar war. Anschließend wurde TNF-BP mit 0,2 M Glycin/HCl, pH 2,5 eluiert.

TNF-BP enthaltende Fraktionen aus 4 Auftrennungen wurden vereinigt und nach Zusatz von Polyethylenglykol (MG 6000) - bis zu einer Endkonzentration von 10 mg/ml - lyophilisiert. Die lyophilisierte Probe wurde in destilliertem Wasser gelöst und gegen destilliertes Wasser dialysiert. (Die dialysierte Probe (4 ml) wurde in tiefgefrorenem Zustand gelagert.)

Dieser Reinigungsschritt brachte gegenüber dem vorangegangenen eine weitere Anreicherung um das ca. 9000 fache. SDS-PAGE (durchgeführt, wie in Vorversuch 2 beschrieben) der TNF-BP enthaltenden Fraktionen zeigte die Elution von drei Hauptkomponenten mit Molekulargewichten von 28 000, 30 000 und 50 000.

d) Reverse Phase Chromatographie

Ein aliquoter Anteil (1 ml) der aus Schritt c) erhaltenen Fraktionen mit einem Zusatz von 0,1 % Trifluoressigsäure wurde auf eine ProRPC HR 5/10 Säule (Pharmacia), die an ein FPLC-System (Pharmacia) angeschlossen war, aufgetragen. Die Säule wurde mit 0,1 %iger Trifluoressigsäure equilibriert und bei Raumtemperatur mit einem linearen 15 ml Gradienten von 10 Vol% bis 50 Vol% Acetonitril, enthaltend 0,1 % Trifluoressigsäure, beschickt; die Durchflußrate betrug 0,3 ml/min. Fraktionen von 0,5 ml wurden gesammelt und die Absorption bei 280nm sowie die Aktivität des TNF- α bindenden Proteins mit Hilfe des Kompetitionsbindungstest, wie im Beispiel 1 angegeben, bestimmt, wobei jeweils 0,01 μ l Probe verwendet wurden. TNF-BP eluierte als ein einziger Aktivitätspeak entsprechend einem scharfen UV-Absorptionspeak.

Dieser letzte Reinigungsschritt brachte eine Zunahme der spezifischen Aktivität um das ca. 29 fache, die

Gesamtzunahme an Aktivität gegenüber dem Ausgangsmaterial (konzentrierter Dialysat) betrug das ca. $1,1 \times 10^4$ fache.

SDS-PAGE der reduzierten und nicht reduzierten Probe, durchgeführt wie in Vorversuch 2 angegeben, ergab eine diffuse Bande, die auf das Vorhandensein eines einzigen Polypeptids mit einem Molekulargewicht von ca. 30 000 hinwies. Das diffuse Erscheinungsbild der Bande kann auf das Vorliegen einer oder mehrerer heterogener Glykosylierungen und/oder eines zweiten, in geringer Menge vorhandenen Polypeptids zurückzuführen sein. Die Annahme, dabei könnte es sich um ein Polypeptid mit dem in Vorversuch 3d als Nebensequenz bestimmten N-Terminus handeln, das gegenüber TNF-BP am N-Terminus verlängert ist, wurde durch die Sequenz der cDNA bestätigt, wonach zwischen der Signalsequenz und Asn (Pos.12) ein Abschnitt von 11 Aminosäuren vorliegt, dessen Sequenz mit der N-terminalen Nebensequenz übereinstimmt und der offensichtlich vom prozessierten Protein abgespalten wird.

Vorversuch 2

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) auf 18 cm langen, 16 cm breiten und 1,5 mm dicken Flachgelen mit 10 Taschen mittels einer LKB 2001 Elektrophorese-Einheit durchgeführt. Der Proteingehalt der Proben aus den Reinigungsschritten c) und d) (Vorversuch 1) wurde mittels Bio-Rad Protein Assay bestimmt bzw. aus der Absorption bei 280 nm berechnet, wobei einer Absorption von 1,0 ein Gehalt von 1 mg TNF-BP/ml zugeordnet wurde.

Die Proben, enthaltend ca. 25 µg Protein (aus Vorversuch 1c) bzw. ca. 5 µg (aus 1d) in reduzierter (β -Mercaptoethanol) und nicht reduzierter Form wurden auf ein 3%iges Sammelgel und ein 5 bis 20%iges lineares Polyacrylamidgradientengel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 25mA/Gel ohne Kühlung gefahren. Als Molekulargewichtsmarker (Pharmacia) wurden Phosphorylase B (MG 94 000), Rinderserumalbumin (MG 67 000), Ovalbumin (MG 43 000), Karboanhydrase (MG 30 000), Sojabohnen-Trypsininhibitor (MG 20 100) und α -Laktalbumin (MG 14 400) verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie Blue in 7%iger Essigsäure/40%igem Ethanol gefärbt und in 7%iger Essigsäure/25%igem Ethanol entfärbt.

Das Ergebnis der SDS-PAGE zeigte TNF-BP als Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von ca. 30.000.

Vorversuch 3

a) Probenvorbereitung

15 µg des nach Vorversuch 1d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1 %ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68 % Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion wurde gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70 %iger Ameisensäure gelöst und direkt für die Aminosäuresequenzanalyse verwendet.

b) Aminosäuresequenzanalyse

Die automatische Aminosäuresequenzanalyse wurde mit einem Applied Biosystems 477 A Flüssigphasensequenzator durch On-line Bestimmung der freigesetzten Phenylthiohydantoin-Derivate mittels Applied Biosystems Analysator, Modell 120 A PTH, durchgeführt.

Sie ergab die folgende N-terminale Sequenz als Hauptsequenz

(ca. 80 % der Proteinmenge): Asp-Ser-Val-Xaa-Pro-Gin-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-

Daneben war folgende Nebensequenz nachzuweisen: Leu-(Val)-(Pro)-(His)-Leu-Gly-Xaa-Arg-Glu-. (Die in Klammer stehenden Aminosäuren konnten nicht eindeutig identifiziert werden.)

Vorversuch 4

SDS-PAGE

8

Die Probenvorbereitung wurde wie im Vorversuch 3 durchgeführt mit dem Unterschied, daß die Probenmenge 10 µg betrug. Die Probe wurde in 50 µl Wasser aufgenommen und in 4 Portionen geteilt. Einer der vier aliquoten Teile wurde zur Reinheitsbestimmung mittels SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (24) mit DTT (Dithiothreitol) reduziert und auf Minigelen (Höfer, 55x80x0,75 mm, 15 %) getrennt; als Molekulargewichtsmarker wurde der im Vorversuch 8 angegebene verwendet. Die Färbung erfolgte nach der Methode von Oakley (Oakley, et al., 1986). Das Elektropherogramm ist in Fig. 9 dargestellt. Es zeigt eine einzige Bande bei einem Molekulargewicht von ca. 30 000.

15 Beispiel 1

a) Tryptic Peptide Mapping

20 Etwa 60 µg des nach Vorversuch 1d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und damit weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion (Retentionszeit etwa 13,0 min) wurde gesammelt, getrocknet und in 60 µl 1%igem Ammoniumbicarbonat gelöst.

25 Dieser Lösung wurden 1% w/w, entsprechend 0,6 µg Trypsin (Boehringer Mannheim) zugesetzt und die Reaktionsmischung 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Danach wurden nochmals 1% w/w Trypsin zugesetzt und die Inkubation über Nacht fortgesetzt.

Zur Reduktion der Disulfidbrücken wurde der Reaktionsansatz anschließend mit 60 µl 6 M Harnstoff und mit 12 µl 0,5 M Dithiothreitol versetzt und 2 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen.

Die Auftrennung der entstandenen tryptischen Spaltpeptide erfolgte über Reverse Phase HPLC, wobei eine Delta Pak C18 Säule (Waters, 3,9 x 150 mm, 5 µm Teilchendurchmesser, 100 Å Porendurchmesser) bei 30 °C und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet wurden. Die Gradientensteigerung betrug 0 bis 55% Eluens B in 55 min, danach wurde 55% B für 15 min beibehalten. Die Flußrate betrug 1 ml/min, die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm (0,5 AUFS) und bei 280 nm (0,65 AUFS).

b) Sequenzanalyse von tryptischen Peptiden

40 Einige der nach a) gewonnenen tryptischen Spaltpeptide von TNF-BP wurden der automatischen Aminosäuresequenzanalyse unterworfen. Dazu wurden die entsprechenden Fraktionen aus der Reverse Phase HPLC gesammelt, getrocknet und in 75 µl 70%iger Ameisensäure gelöst. Diese Lösungen wurden direkt für die Sequenzierung in einem Applied Biosystems 477 A Pulsed Liquid Phase Sequenator eingesetzt. Tab.1 enthält die Ergebnisse der Sequenzanalyse der tryptischen Peptide, wobei die in Klammern angeführten Aminosäuren nicht mit Sicherheit nachgewiesen werden konnten. Die Angabe "Xaa" bedeutet, daß an dieser Stelle die Aminosäure nicht identifiziert werden konnte.

In der Fraktion 8 konnte die Aminosäure in Position 6 nicht identifiziert werden. Die Sequenz -Xaa-Asn-Ser- für die Position 6-8 läßt vermuten, daß die Aminosäure 6 in glykosylierter Form vorliegt.

50 In der Fraktion 17 konnte die Aminosäure in Position 6 ebenfalls nicht identifiziert werden. Die Sequenz -Xaa-Asn-Ser- (bereits in Fraktion 8 auftretend) für die Positionen 6 bis 8 läßt vermuten, daß die Aminosäure 6 in glykosylierter Form vorliegt. Die ersten 13 Aminosäuren der Fraktion 17 sind weitgehend identisch mit der Fraktion 8; bei Fraktion 17 dürfte es sich somit um ein Peptid handeln, das durch unvollständige tryptische Spaltung entstanden ist.

55 Auffallend ist die Identität der Fraktion 21 mit den Positionen 7 bis 14 der Fraktion 27. Sowohl in Fraktion 21 als auch in Fraktion 27 bricht die Sequenz nach der Aminosäure Asparagin (Position 8 bzw. 14) plötzlich ab, obwohl hier keine tryptische Spaltung zu erwarten ist. Dies ist ein Hinweis darauf, daß die Aminosäure Asparagin (Position 8 in Fraktion 21 bzw. Position 14 in Fraktion 27) die C-terminale

Aminosäure von TNF-BP sein könnte.

Auffallend ist die weitgehende Identität der Sequenz der nur in geringer Menge auftretenden Fraktion 12 mit der in Vorversuch 10 bestimmten Nebensequenz des N-Terminus. Daß die Proteine der Haupt- und Nebensequenz auf einer analytischen Reverse Phase HPLC-Säule (Vorversuch 3b) nicht trennbar waren, lieferte einen Hinweis dafür, daß es sich bei dem Protein mit der Nebensequenz um eine am N-Terminus verlängerte Form des TNF-BP handelt, die durch Prozessierung zum Großteil in das Protein mit der Hauptsequenz überführt wird.

Fraktion Aminosäuresequenz

1 Asp - Ser - Val - Cys - Pro - Gln - Gly - Lys

2 Xaa - Xaa - Leu - Ser -(Cys)- Ser - Lys

3 Asp - Thr - Val - (Cys)- Gly -(Cys)- Arg

- 4 Glu - Asn - Glu - (Cys)- Val - Ser - (Cys) -
Ser - Asn -(Cys) - Lys
- 5 Glu - Asn - Glu -(Cys)- Val - Ser - (Cys)-
(Ser)- Asn - (Cys)-Lys - (Lys)
- 8 Tyr - Ile - His - Pro - Gln - Xaa - Asn - Ser
- Ile - Xaa - Xaa - Xaa - Lys
- 11 Glu - Cys - Glu - Ser - Gly - Ser - Phe - Thr
- Ala - Ser - Glu - Asn -(Asn) - (Lys)
- 12 Leu - Val - Pro - His - Leu - Gly - Asp - Arg
- 13 Lys - Glu - Met - Gly - Gln - Val - Glu - Ile
- Ser - Ser - (Cys)- Thr - Val - Asp - (Arg)
- 14/I Gly - Thr - Tyr - Leu - Tyr - Asn - Asp - Cys
- Pro - Gly - Pro - Gly - Gln -
- 14/II (Glu) - Met - Gly - Gln - Val -(Glu)- (Ile) -
(Ser)- Xaa - Xaa - Xaa - (Val) -(Asp)-
- 15 Lys - Glu - Met - Gly - Gln - Val - Glu - Ile
- Ser - Ser - (Cys) - Thr - Val - Asp - Arg -
Asp - Thr - Val - (Cys) - Gly -
- 17 Tyr - Ile - His - Pro - Gln - Xaa - Asn - Ser
- Ile - (Cys) - (Cys)- Thr - Lys - (Cys) - His
- Lys - Gly - Xaa - Tyr -
- 20 Gly - Thr - Tyr - Leu - Tyr - Asn - Asp - Cys
- Pro - Gly - Pro - Gly - Gln - Asp - Thr -
Xaa - Xaa - Arg

21 Leu - (Cys) - Leu - Pro - Gln - Ile - Glu -
Asn

26 Gln - Asn - Thr - Val - (Cys) - Thr - Xaa -
(His) - Ala - Gly - Phe - (Phe) - Leu - (Arg)

27 Ser - Leu - Glu - (Cys) - Thr - Lys - Leu -
(Cys) - Leu - Pro - Gln - Ile - Glu - Asn

Tabelle 1: Aminosäuresequenzen der analysierten
tryptischen Peptide von TNF-BP

Beispiel 2

Analyse des C-Terminus

Diese Analyse wurde nach dem Prinzip der in (Hsieng et al., 1988) beschriebenen Methode durchgeführt.

Etwa 60 µg des nach Vorversuch 2d) gereinigten Proteins wurden über Reverse Phase HPLC entsalzt und damit weiter gereinigt. Dazu wurden eine Bakerbond WP C18 Säule (Baker; 4,6 x 250 mm) und 0,1%ige Trifluoressigsäure in Wasser (Eluens A) bzw. in Acetonitril (Eluens B) als mobile Phase verwendet. Die Gradientensteigerung betrug 20 bis 68% Eluens B in 24 min. Die Detektion erfolgte parallel bei 214 nm und bei 280 nm. Die TNF-BP enthaltende Fraktion (Retentionszeit etwa 13,0 min) wurde gesammelt, getrocknet und in 120 µl 10 mM Natriumacetat (auf pH 4 gestellt mit 1 N HCl) gelöst.

Dieser Lösung wurden 8 µl Brij 35 (10 mg/ml in Wasser) sowie 1,5 µl Carboxypeptidase P (0,1 mg/ml in Wasser, Boehringer Mannheim, Nr. 810142) zugesetzt. Das entspricht einem Gewichtsverhältnis Enzym zu Protein von 1 zu 400 (Frohman et al., 1988).

Sofort nach Zusatz des Enzyms wurde eine Probe von 20 µl der Reaktionsmischung entnommen und darin die enzymatische Reaktion durch Ansäuern mit 2 µl konzentrierter Trifluoressigsäure und durch Gefrieren bei -20°C unterbrochen.

Die Reaktionsmischung wurde im Kühlschrank (ca. 8°C) stengelassen und Proben zu je 20 µl nach 10, 20, 60 und 120 Minuten entnommen. Der Rest der Reaktionsmischung wurde weitere 120 Minuten bei Raumtemperatur belassen. Alle Proben wurden sofort nach der Entnahme durch Zusatz von 2 µl konzentrierter Trifluoressigsäure angesäuert und bei -20°C eingefroren, wodurch die enzymatische Reaktion unterbrochen wurde.

Parallel zum beschriebenen Probenansatz mit etwa 60 µg TNF-BP wurde unter identischen Bedingungen ein Reagentienblindwert angesetzt, dem kein Protein zugesetzt worden war.

Nach der letzten Probennahme wurden alle Proben 30 Minuten lang in einem Speed Vac Concentrator getrocknet, mit 10 µl einer Lösung aus 2 Teilen Äthanol, 2 Teilen Wasser und 1 Teil Triäthylamin (= "Redrying solution" des Picotag-Aminosäureanalyse-Systems der Fa. Waters) versetzt und nochmals kurz getrocknet. Danach wurden die Proben zur Derivatisierung der vom C-Terminus abgespalteten Aminosäuren mit je 20 µl des "Derivatisation Reagens" (7:1:1:1 = Äthanol : Wasser : Triäthylamin : Phenylisothiocyanat; Picotag-System) versetzt, 20 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und dann 1 Stunde in einem Speed Vac Concentrator getrocknet.

Zur Analyse der derivatisierten Aminosäuren wurden die Proben in 100 µl "Sample Diluent" (Picotag-System der Fa. Waters) gelöst. Von dieser Lösung wurden je 50 µl mit Reverse Phase-HPLC (Säule, mobile Phase und Gradient nach Originalvorschrift des Picotag-Systems der Fa. Waters) analysiert. Die Chromatogramme der Proben und Reagentienblindwerte wurden mit dem Chromatogramm eines analog

derivatisierten Gemisches (100% V/Aminosäure) von Standardamino-säuren (Fa. Beckman) verglichen.

Wie aus den quantitativen Ergebnissen der Picotag-Aminosäureanalyse (Tabelle 2) ersichtlich ist, ist Asparagin mit hoher Wahrscheinlichkeit die C-terminale Aminosäure von TNF-BP. Neben Asparagin konnten nach 240 Minuten Reaktionszeit auch Glutaminsäure und in geringerer Menge Isoleucin nachgewiesen werden. Signifikant über dem Reagentienblindwert liegende Mengen von anderen Aminosäuren konnten auch nach 240 Minuten Reaktionszeit nicht gefunden werden. Dieses Ergebnis (-Ile-Glu-Asn als C-Terminus) bestätigt die aus der N-terminalen Sequenzierung der tryptischen Peptide 21 und 27 abgeleitete Vermutung, daß die bei diesen Peptiden C-terminal identifizierten Aminosäuren - Ile-Glu-Asn (Beispiel 1b) den C-Terminus von TNF-BP darstellen.

Tabelle 2:

Reaktionszeit	Integratoreinheiten für die Aminosäuren		
	Isoleucin	Glutaminsäure	Asparagin
0	.	.	.
10	.	.	.
20	.	.	.
60	.	.	83.304
120	.	.	168.250
240	85.537	152.350	319.470
			416.570

Quantitative Auswertung der Picotag-Aminosäureanalyse nach Reaktion von Carboxypeptidase P mit TNF-BP

Methoden zu den Beispielen 3 bis 7:

In den nachfolgenden Beispielen wurden, sofern nicht ausdrücklich anders angegeben, molekularbiologische Standardmethoden verwendet, die einschlägigen Handbüchern entnommen werden können bzw. den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen entsprechen. Um die Beschreibung der nachfolgenden Beispiele zu vereinfachen, werden oft wiederkehrende Methoden bzw. Bezeichnungen kurz beschrieben:

"Schneiden" oder "Verdauen" von DNA bezieht sich auf die katalytische Spaltung der DNA mittels Restriktionsendonukleasen (Restriktionsenzymen) an für diese spezifischen Stellen (Restriktionsstellen). Restriktionsendonukleasen sind käuflich erhältlich und werden unter den von den Herstellern empfohlenen Bedingungen (Puffer, Rinderserumalbumin (BSA) als Trägerprotein, Dithiothreitol (DTT) als Oxidationsschutz) eingesetzt. Restriktionsendonukleasen werden mit einem Großbuchstaben, meist gefolgt von Kleinbuchstaben und normalerweise einer römischen Ziffer, bezeichnet. Die Buchstaben hängen von dem Mikroorganismus ab, aus dem die betreffende Restriktionsendonuklease isoliert wurde (z.B.: Sma I: *Serratia marcescens*). Üblicherweise wird etwa 1 µg DNA mit einer oder mehreren Einheiten des Enzyms in etwa 20 µl Pufferlösung geschnitten. Normalerweise wird eine Inkubationsdauer von 1 Stunde bei 37°C verwendet, kann aber laut den Verwendungsvorschriften des Herstellers variiert werden. Nach dem Schneiden wird manchmal die 5' Phosphatgruppe durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm (CIP) entfernt. Dies dient zur Verhinderung einer ungewünschten Reaktion der spezifischen Stelle in einer nachfolgenden Ligasereaktion (z.B. Zirkularisierung eines linearisierten Plasmids ohne Insertierung eines zweiten DNA-Fragmentes). Wenn nicht anders angegeben, werden DNA-Fragmente nach dem Schneiden mit Restriktionsendonukleasen normalerweise nicht dephosphoryliert. Reaktionsbedingungen für die Inkubation mit alkalischer Phosphatase sind z.B. dem M13 Cloning und Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) zu entnehmen. Nach der Inkubation wird Protein durch Extraktion mit Phenol und Chloroform entfernt und die DNA aus der wäßrigen Phase durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Isolierung" eines bestimmten DNA Fragments bedeutet die Auftrennung der durch den Restriktionsverdau erhaltenen DNA-Fragmente, z.B. auf einem 1% Agarosegel. Nach der Elektrophorese und dem Sichtbarmachen der DNA im UV-Licht durch Anfärben mit Äthidiumbromid (EtBr) wird das gewünschte Fragment anhand mitaufgetragener Molekulargewichtsmarker lokalisiert und durch weitere Elektrophorese

an DE 81 Papler (Schäfer und Schüll) gebunden. Die DNA wird durch Spülen mit Niedrigsalzpuffer (200 mM NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) gewaschen und anschließend mit einem Hochsalzpuffer (1 M NaCl, 20 mM Tris pH=7,5, 1 mM EDTA) eluiert. Die DNA wird durch Zusatz von Äthanol präzipitiert.

"Transformation" bedeutet das Einbringen von DNA in einen Organismus, so daß die DNA dort replizierbar ist, entweder extrachromosomal oder chromosomal integriert. Transformation von E.coli folgt der im M13 Cloning and Sequencing Handbuch (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) angegebenen Methode.

"Sequenzieren" einer DNA bedeutet die Bestimmung der Nukleotidsequenz. Dazu wird zunächst die zu sequenzierende DNA mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten, und die Fragmente werden in entsprechend geschnittene M13 mp8, mp9, mp18 oder mp19 Doppelstrang DNA eingebracht, oder es werden die DNA mittels Ultraschall fragmentiert, die Enden repariert und die größenselektierten Fragmente in Sma I geschnittene, dephosphorylierte M13 mp8 DNA eingebracht (Shotgun Methode). Nach der Transformation von E.coli JM 101 wird Einzelstrang DNA aus rekombinanten M13 Phagen entsprechend dem M13 Cloning and Sequencing manual (Cloning and Sequencing Handbook, Fa. Amersham, PI/129/83/12) isoliert und nach der Didesoxymethode (Sanger et al., 1977) sequenziert. Als Alternative zur Verwendung des Klenowfragment der E.coli DNA Polymerase I bietet sich dabei die T7-DNA Polymerase an ("Sequenase, Fa. United States Biochemical Corporation). Die Sequenzreaktionen werden entsprechend dem Handbuch "Sequenase: Step-by-Step Protocols for DNA Sequencing-With Sequenase" (Version 2.0) durchgeführt.

Eine weitere Sequenziermethode besteht im Klonieren der zu sequenzierenden DNA in einen Vektor, der unter anderem einen Replikationsursprung eines DNA-Einzelstrangphagen (M13, fl) trägt (z.B. Bluescribe oder Bluescript M13 von Stratagene). Nach Transformation von E.coli JM101 mit dem rekombinanten Molekül können die Transformanten mit einem Helferphagen, z.B. M13K07 oder R408 von Promega) infiziert werden. Als Resultat erhält man eine Mischung aus Helferphagen und verpacktem, einzelsträngigem rekombinanten Vektor. Die Aufarbeitung der Sequenziervorlage (Template) erfolgt in Analogie zu der M13 Methode. Doppelsträngige Plasmid-DNA wurde entsprechend dem oben angeführten Sequenzierhandbuch durch Alkalibehandlung denaturiert und direkt sequenziert.

Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels der ursprünglich von R. Staden (Staden et al., 1982) entwickelten und von Ch. Pieler (Pieler, 1987) modifizierten Computerprogramme.

"Ligieren" bezieht sich auf den Prozeß der Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen zwei Enden von Doppelstrang-DNA Fragmenten. Üblicherweise werden zwischen 0,02 und 0,2 µg DNA-Fragmente in 10 µl mit etwa 5 units T4-DNA Ligase ("Ligase") in einer geeigneten Pufferlösung ligiert (Maniatis et al., 1982). "Präparation" von DNA aus Transformanten bedeutet die Isolierung der Plasmid DNA aus Bakterien mittels der alkalischen SDS Methode, modifiziert nach Birnboim und Doly, unter Weglassen des Lysozyms. Dabei werden die Bakterien aus 1,5 bis 50 ml Kultur verwendet.

"Oligonukleotide" sind kurze Polydesoxynukleotide, die chemisch synthetisiert werden. Dazu wurde der Applied Biosystems Synthesizer Modell 381A verwendet. Die Oligonukleotide werden entsprechend dem Modell 381A User Manual (Applied Biosystems) aufgearbeitet. Sequenzprimer werden ohne weitere Reinigung direkt eingesetzt. Andere Oligonukleotide werden bis zu einer Kettenlänge von 70 durch die "OPC"-Methode gereinigt (OPC = Oligonucleotid purification column, Applied Biosystems, Product Bulletin, January 1988). Längere Oligonukleotide werden durch Polyacrylamidgelelektrophorese (8% Acrylamid, 0,15% Bisacrylamid, 8 M Harnstoff, TBE-Puffer) gereinigt und nach der Elution aus dem Gel über eine G-25 Sepharosesäule entsalzt.

Beispiel 3

Herstellung von TNF-BP-spezifischen Hybridisierungssonden

Die Auswahl der Oligonukleotide wurde im Hinblick auf deren Verwendung zur Amplifizierung von cDNA mittels PCR getroffen:

a) Aus der N-terminalen Aminosäuresequenz des TNF-Bindungsproteins (Hauptsequenz, erhalten aus Vorversuch 3 und Beispiel 1, Fraktion 1)

Asp-Ser-Val-Cys-Pro-Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro-Gln-

wurde ein Heptapeptid-Bereich ausgewählt, der die niedrigste Komplexität eines gemischten Oligonukleotids zum Hybridisieren an cDNA zuläßt: Es sind dies die Aminosäuren 8 bis 12. Um die Komplexität des Mischoligonukleotids herabzusetzen, wurden vier Mischoligonukleotide mit einer Komplexität von jeweils 48

hergestellt. Die Oligonukleotide wurden in Richtung der mRNA hergestellt, sie sind somit zum 3' Ende der Sequenz orientiert und identisch mit dem nichtkodierenden Strang des TNF-BP-Gens:

Gln-Gly-Lys-Tyr-Ile-His-Pro

5'CAA GGT AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/1 EBI-1639

G G C C C
A

5'CAA GGC AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/2 EBI-1640

G G C C C
A

5'CAA GGA AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/3 EBI-1641

G G C C C
A

5'CAA GGG AAA TAT ATT CAT CC 3'TNF-BP #3/4 EBI-1642

G G C C C
A

b) Aus der Aminosäuresequenz eines tryptischen Peptides (Fraktion 11 des tryptischen Verdaus) der Aminosäuresequenz Glu-Cys-Glu-Ser-Gly-Ser-Phe-Thr-Ala-Ser-(Glu/Cys)-Asn-Asn-Lys (vgl. Beispiel 1) wurde ein Peptid-Bereich ausgewählt und ein weiterer Satz von Mischoligonukleotiden synthetisiert:

-Phe-Thr-Ala-Ser-Glu-Asn-Asn-Lys

Cys

TNF-BP #4/5 (EBI-1653):

3'AAA TGA CGG AGA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'
G G T T T
T

TNF-BP #4/6 (EBI-1654):

3'AAA TGA CGG TCA CTC TTG TTG TT CCTAGGG 5'
G G T G T
T

TNF-BP #4/7 (EBI-1657):

3'AAA TGA CGG AGA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
G G T T G
T

TNF-BP #4/8 (EBI-1658):

3'AAA TGA CGG TCA ACA TTG TTG TT CCTAGGG 5'
G G T G G
T

Die Oligonukleotide wurden komplementär zur mRNA synthetisiert und sind somit zum 5' Ende der Sequenz orientiert. Um das amplifizierte DNA-Fragment im Anschluß an die PCR effizient klonieren zu können, wurde auch ein BamHI-Linker am 5' Ende der Oligonukleotide vorgesehen. Werden z.B. die Oligonukleotide TNF-BP #4/5-8 gemeinsam mit TNF-BP #3/1-4 für die PCR an der gesamten λ -DNA einer Bibliothek eingesetzt, kann ein etwa resultierendes DNA Fragment mit BamHI nachgeschnitten werden. Die Partner-Oligonukleotide ergeben ein gerades Ende am 5' Terminus, das Fragment kann somit in die SmaI-BamHI-Stellen eines geeigneten Vektors kloniert werden.

Jedes Mischoligonukleotid TNF-BP #4/5 bis 8 ist eine Mischung aus 48 Einzelnukleotiden und berücksichtigt einige Codons nicht, und zwar:

Thr ACG

Ala GCG und GCT

Ser TCG und TCC

Asn AAT

Bei GCT wird die Möglichkeit in Betracht gezogen, daß das zu GCC (Ala) komplementäre Triplet 2GG durch Ausbildung einer G-T Brücke wirksam sein kann, bei TCG (Ser) und AAT (Asn) gilt dasselbe bezüglich AGT bzw. TTG.

ACG, GCG und TCG sind äußerst seltene Codons (CG-Regel) und wurden deshalb nicht berücksichtigt.

Beispiel 4

Amplifizierung einer für TNF-BP kodierenden Teilsequenz aus einer cDNA-Bibliothek.

a) Isolierung von λ -DNA einer cDNA Bibliothek

Die Herstellung der cDNA Bibliothek erfolgte nach der in der EP-A1-0293 567 für die humane plazentale cDNA Bibliothek beschriebenen Methode mit dem Unterschied, daß als Ausgangsmaterial 10⁹ Fibrosarkomzellen der Zelllinie HS 913 T, die unter Stimulierung mit humanem TNF- α (10 ng/ml) hochgezüchtet worden waren, verwendet wurden. Statt λ gt10 wurde λ gt11 verwendet (cDNA Synthese: Amersham RPN 1258; EcoRI verdaute λ gt11 Arme: Promega Biotech; in vitro Verpacken der ligierten DNA: Gigapack Plus, Stratagene).

5 ml des Phagenüberstandes der amplifizierten cDNA Bibliothek der humanen Fibrosarkom Zelllinie HS913T in λ gt11 wurden mit 0,5 μ g RNase A und 0,5 μ g DNase I versetzt und eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Mischung wurde 10 min bei 5000xg zentrifugiert, der Überstand durch Extraktion mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA aus der wässrigen Phase durch Zusatz von Ethanol präzipitiert. Die λ -DNA wurde in TE-Puffer (10 mM Tris pH = 7,5; 1 mM EDTA) gelöst.

b) PCR Amplifizierung einer TNF-BP Sequenz aus einer cDNA Bibliothek

Für die Anwendung der PCR (Saiki et al., 1988) auf DNA der HS913T cDNA Bibliothek wurden 16 Einzelreaktionen durchgeführt, in welchen jeweils eines der 4 Mischoligonukleotide EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641, EBI-1642 als erster Primer und eines der vier Mischoligonukleotide EBI-1653, EBI-1654, EBI-1657, EBI-1658 als zweiter Primer eingesetzt wurde. Jedes dieser Mischoligonukleotide enthält 48 verschiedene Oligonukleotide gleicher Länge.

Die Amplifizierung mittels PCR fand in 50 μ l Reaktionsvolumen, enthaltend 250 ng λ -DNA der cDNA-Bibliothek, 50 mM KCl, 10 mM Tris pH = 8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 0,2 mM jedes der 4 desoxy-Nukleosidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 200 pMol erster und zweiter Primer, 1,25 Einheiten Taq Polymerase [Perkin-Elmer Cetus] statt. Um ein Verdunsten zu verhindern, wurde die Lösung mit einigen Tropfen Mineralöl (0,1 ml) überschichtet. Die PCR wurde in einem DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus) folgendermaßen durchgeführt: Die Proben wurden 5 Minuten auf 94 °C erhitzt, um die DNA zu denaturieren, und anschließend 40 Amplifikationszyklen unterworfen. Ein Zyklus bestand aus 40 Sekunden Inkubation bei 94 °C, 2 Minuten Inkubation bei 55 °C und 3 Minuten Inkubation bei 72 °C. Am Ende des letzten Zyklus wurden die Proben für weitere 7 Minuten bei 72 °C inkubiert, um sicherzustellen, daß die letzte Primer-Verlängerung vollständig verläuft. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit Phenol und Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Äthanol präzipitiert.

5 μ l jeder der 16 PCR-Proben wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Länge der amplifizierten DNA-Fragmente nach elektrophoretischer Auftrennung bestimmt. Die stärkste DNA Bande, ein Fragment von 0,16 kb Länge, war in den PCR-Proben zu sehen, die mit dem Oligonukleotid EBI-1653 als erstem Primer und einem der Oligonukleotide EBI-1639, EBI-1640, EBI-1641 oder EBI-1642 als zweitem Primer amplifiziert worden waren. Da die mit dem Primerpaar EBI-1653 und EBI-1642 amplifizierte Probe die größte Menge an diesem 0,16 kb DNA-Fragment enthielt, wurde diese Probe für die weitere Aufarbeitung ausgewählt.

Beispiel 5:

Klonierung und Sequenzierung eines durch PCR Amplifikation gewonnenen DNA-Fragments

Das erhaltene PCR-Produkt der Primer EBI-1642 und EBI-1653 wurde mit BamHI geschnitten und nachfolgend elektrophoretisch in einem Agarosegel (1,5% Nusieve GTG Agarose plus 1% Seakem GTG Agarose, FMC Corporation) nach der Größe aufgetrennt. Die Hauptbande, ein DNA Fragment von 0,16 kb Länge, wurde aus dem Gel elektroeluiert und mit Ethanol präzipitiert. Dieses DNA Fragment wurde mit BamHI/SmaI geschnittenem Plasmid pUC18 (Pharmacia) ligiert und E. coli JM101 mit dem Ligationsgemisch transformiert. Die nach der Minipräparationsmethode hergestellten Plasmide wurden durch Schneiden mit den Restriktionsenzymen PvuII und EcoRI-BamHI und nachfolgender Elektrophorese in Agarosegelelen charakterisiert. Das Plasmid pUC18 enthält zwei Schnittstellen für PvuII, die in einem 0,32 kb DNA-Fragment die Polyklonierstelle flankieren. Sehr kurze DNA-Inserts in der Polyklonierstelle des Plasmids können nach Schneiden mit PvuII leichter im Agarosegel sichtbar gemacht werden, da sich die Länge um 0,32 kb vergrößert. Durch Schneiden mit EcoRI und BamHI kann das in den mit BamHI und SmaI

geschnittenen Plasmidvektor ligierte DNA-Fragment inklusive einiger Basenpaare der Polylinkersequenz erhalten werden. Ein Klon mit dem gewünschten Insert wurde als pTNF-BP3B bezeichnet. Das gesamte DNA-Insert dieses Klon wurde nach Subklonieren eines EcoRI-BamHI Fragments in M13mp18 (Pharmacia) nach der modifizierten Dideoxy Methode mit Sequenase (United States Biochemical Corporation) sequenziert.

Die Analyse der durch PCR-amplifizierten DNA ergab folgende Sequenz (nur der nicht kodierende Strang ist abgebildet, darüber die abgeleitete Aminosäuresequenz):

```

      5                               10
10  Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys
    CAG GGG AAA TAT ATT CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC
      15                               20                               25
15  Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp
    TGT ACC AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC

      30                               35
20  Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys
    TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT

      40                               45                               50
25  Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn Asn Lys
    GAG AGC GGC TCC TTC ACA GCC TCA GAA AAC AAC AAG GAT CC
30

```

Die ersten 20 und die letzten 29 Nukleotide (in Kursivschrift) entsprechen den Sequenzen der Primer-Oligonukleotide EBI-1642 bzw. dem Komplement von EBI-1653. Die Aminosäuren 38 bis 43 bestätigen die restliche Sequenz des tryptischen Peptides 11.

Weiters enthält das mittels PCR erzeugte DNA-Fragment die Sequenz des Peptides der Fraktion 20 des tryptischen Verdaus (Aminosäuren 20 bis 34, unterstrichen). Damit ist erwiesen, daß der Klon pTNF-BP3B von einer cDNA abgeleitet wurde, die für TNF-Bindungsprotein kodiert. pTNF-BP3B stellt damit eine Sonde, z.B. zum Durchsuchen von cDNA-Bibliotheken nach TNF-PP cDNAs, dar.

Beispiel 6:

Isolierung von TNF-BP cDNA Klonen

Ca. 720.000 Phagen der HS913T cDNA Bibliothek in λ gt11 wurden auf E.coli Y1088 (Δ lacU169, pro::Tn5, tonA2, hsdR, supE, supF, metB, trpR, F⁻, λ -, (pMC9)) plattiert (ca. 60.000 Phagen pro 14,5 cm Petrischale, LB-Agar: 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl, 1,5% Agar, Plattieren in Top-Agarose: 10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 0,8% Agarose). Von jeder Platte wurden zwei Nitrozellulosefilter-Abzüge hergestellt. Die Filter wurden vorgewaschen (16 Stunden bei 65° C) in:

50 mM Tris/HCl pH = 8,0

1 M NaCl

1 mM EDTA

0,1 % SDS

Die Filter wurden zwei Stunden bei 65° C prähybridisiert in:

6x SSC (0,9M NaCl, 0,09 M tri-Na-citrat)

5x Denhardt's (0,1% Ficoll, 0,1% Polyvinylpyrrolidon, 0,1% BSA (= Rinderserumalbumin))

0,1% SDS

Herstellung der radioaktiv markierten Sonde:

- 5 pTNF-BP 38 wurde mit BamHI und EcoRI doppelt geschnitten und das ca. 0,16 kb Insert isoliert. 0,6 µg des Inserts in 32 µl werden bei 100 °C denaturiert und mit je 60 pMol EBI-1842 und EBI-1853 durch Abkühlen auf 80 °C über 10 Minuten und jähes Abkühlen in Eiswasser geprimt. Nach Zusatz von 10 µl α-³²P-dCTP (100 µCi, 3,7 MBq)
- 10 5 µl 10x Priming Puffer (0,1 M Tris/HCl pH = 8,0, 50 mM MgCl₂)
2 µl je 1mm dATP, dGTP, dTTP
1 µl PolIK (Klenow Fragment der E.coli DNA Polymerase I, 5 Einheiten)
- wurde 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Hitzeinaktivierung (10 Minuten auf 70 °C) erfolgte das Abtrennen der nichteingebauten Radioaktivität durch Chromatographie über Biogel P6DG (Biorad) in TE Puffer (10 mM Tris/HCl pH = 8, 1 mM EDTA). Eingebaut wurden 65x10⁶ cpm.
- 15 Das Hybridisieren der Filter erfolgte in einem Gesamtvolumen von 80 ml 6xSSC/5X Denhardt's/0,1% SDS plus hitzedenaturierter Hybridisierungsprobe während 18 Stunden bei 65 °C.
Die Filter wurden zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur in 6xSSC/0,01% SDS und einmal 45 Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSC/0,01% SDS und dreimal 30 Minuten bei 65 °C in 2xSSC/0,01% SDS gewaschen. Die Filter wurden luftgetrocknet und anschließend an Amersham Hyperfilm 18 Stunden unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70 °C exponiert. Insgesamt wurden 30 hybridisierende Plaques identifiziert (λ-TNF-BP #1-30).
- 20 Die Regionen mit den hybridisierenden Plaques wurden möglichst präzise ausgestochen, und die Phagen in 300 µl SM Puffer plus 30 µl Chloroform eluiert.
25 Durch "Plaquareinigung" (Plattieren von ca. 200 Phagen pro 9 cm Petrischale beim zweiten Durchgang, bzw. ca. 20 Phagen pro 9 cm Petrischale beim dritten Durchgang, Filterabzüge doppelt, Vorbereiten, Hybridisieren und Waschen wie beim erstmaligen Durchsuchen beschrieben) wurden letztlich 25 hybridisierende Phagen vereinzelt (λ-TNF-BP #1-10, 12-24, 29,30).

- 30 Darstellung der rekombinanten λ-DNA von den Klonen λ-TNF-BP #13, 15, 23, 30:

- 2x10⁶ Phagen wurden auf E.coli Y1088 in Topagarose (10 g/l Trypton, 8 g/l NaCl, 0,8% Agarose) plattiert (14,5 cm Petrischale mit LB-Agarose (1,5% Agarose, 0,2% Glucose, 10 mM MgSO₄, 10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) und 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Abkühlen der Platten (30 Minuten bei 4 °C) wurde mit 10 ml λ-Diluent (10 mM Tris/HCl pH = 8,0, 10 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA) überschichtet und 18 Stunden bei 4 °C eluiert. Der Überstand wurde in 15 ml Corex Röhrchen transferiert und 10 Minuten bei 15000 rpm und 4 °C zentrifugiert (Beckman J2-21 Zentrifuge, JA20 Rotor). Der Überstand wurde in 10 ml Polycarbonat-Röhrchen dekantiert und bei 50000 rpm, 20 °C bis ω_t = 3x10¹⁰ zentrifugiert (Beckman L8-70, 50 Ti Rotor). Das Pellet wurde in 0,5 ml λ-Diluent resuspendiert und in Eppendorf Röhrchen (1,4 ml) transferiert. Nach Zusatz von 5 µg RNase A und 0,5 µg DNaseI und Inkubation bei 37 °C während 30 Minuten und Zusatz von 25 µl 0,5 M EDTA, 12,5 µl 1 M Tris/HCl pH = 8,0, 6,5 µl 20% SDS erfolgte weitere Inkubation bei 70 °C für 30 Minuten. Die λ-DNA wurde durch Phenol/Chloroform Extraktion gereinigt und mit Ethanol gefällt. Abschließend wurde die DNA in 100 µl TE-Puffer gelöst.

Beispiel 7:

- 50 Subklonierung und Sequenzierung von TNF-BP cDNA Klonen 15 und 23

- Um die cDNAs der Klone λTNF-BP15 und λTNF-BP23, die bei der Hybridisierung die stärksten Signale gezeigt hatten, näher zu charakterisieren, wurden die cDNA-Inserts mit EcoRI aus der λ-DNA herausgeschnitten, nach elektrophoretischer Auftrennung aus einem Agarosegel eluiert und mit Äthanol präzipitiert.
- 55 Die DNA-Fragmente von 1,3 kb (von λTNF-BP15) und 1,1 kb (von λTNF-BP23) wurden mit EcoRI geschnitten und mit alkalischer Phosphatase aus Kalbsdarm dephosphoryliertem Plasmidvektor pT7/T3a-18 (Bethesda Research Laboratories) mit T4 DNA Ligase ligiert und E.coli JM101 transformiert. Von einzelnen Bakterienkolonien, die nach Selektion auf Agaroseplatten mit Ampicillin und X-gal keine blaue

Färbung aufwiesen, wurde im Minipräparationsverfahren Plasmid-DNA hergestellt und durch Schneiden mit EcoRI und HindIII das Vorhandensein und die Orientierung des cDNA Inserts festgestellt. Plasmide, die das EcoRI Insert der Phagen λ TNF-BP15 bzw. λ TNF-BP23 so orientiert enthielten, daß das dem 5'-Ende der mRNA entsprechende Ende dem T7 Promoter zugewandt ist, wurden pTNF-BP15 bzw. pTNF-BP23 benannt. Die EcoRI Inserts von λ TNF-BP15 und λ TNF-BP23 wurden ebenfalls in mit EcoRI geschnittenen und dephosphorylierten M13mp19 Vektor ligiert und E.coli JM101 transformiert. Von einigen wahllos ausgewählten M13 Klonen wurde Einzelstrang-DNA präpariert und als Vorlage für die Sequenzierung nach der Didesoxy-Methode verwendet.

An M13-Klonen, die die cDNA-Inserts in entgegengesetzter Orientierung enthielten, wurden mit dem universellen Sequenzierprimer und spezifisch synthetisierten Oligonukleotidprimern, die an das cDNA-Insert binden, beide DNA-Stränge vollständig sequenziert.

Die vollständige Nukleotidsequenz von 1334 Basen des cDNA-Inserts von λ TNF-BP15 bzw. pTNF-BP15 ist in Fig.1 dargestellt. Die Basen 1-8 und 1328-1334 entsprechen den EcoRI-Linkern, die bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek an die cDNA angefügt worden waren. Die Nukleotidsequenz des cDNA-Inserts von λ TNF-BP23 entspricht der von λ TNF-BP15 (Basen 22-1100), flankiert von EcoRI-Linkern.

Der Klon λ TNF-BP30 wurde ebenfalls untersucht; seine Sequenz entspricht λ TNF-BP15 mit dem Unterschied, daß die Sequenz eine Deletion von 74 bp (Nukleotid 784 bis 837) aufweist.

20 Beispiel 8

Konstruktion der Expressionsplasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2

Aus Teilen der Expressionsplasmide pCDM8 (Seed und Aruffo, 1987; Seed, 1987; Invitrogen), pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321 842) und dem Plasmid Bluescript SK+ (Short et al., 1988; Stratagene) wurde ein neues Plasmid konstruiert, das eine Multiklonierstelle für die gerichtete Insertion heterologer DNA-Sequenzen aufweist und sich in E.coli mittels Ampicillinresistenz mit hoher Kopienzahl vermehren läßt. Die intergenische Region von M13 ermöglicht die Herstellung einzelsträngiger Plasmid-DNA mit Superinfektion der transformierten Bakterien mit einem Helferphagen (z.B. R408 oder M13K07) zur erleichterten Sequenzierung und Mutagenese der Plasmid-DNA. Der T7 Promoter, der der Multiklonierstelle vorangeht, ermöglicht die Herstellung von RNA Transkripten in vitro. In Säugetierzellen erfolgt die Expression heterologer Gene getrieben vom Cytomegalovirus (CMV) Promoter/Enhancer (Boshart et al., 1985). Der SV40 Replikationsursprung ermöglicht in geeigneten Zelllinien (z.B. SV40 transformierte Zellen wie COS-7, Adenovirus transformierte Zelllinie 293 (ATCC CRL1573) die autonome Replikation des Expressionsplasmides zu hohen Kopienzahlen und damit hohe Raten in transienter Expression. Für die Herstellung permanenter transformierter Zelllinien und die nachfolgende Amplifikation der Expressionskassette mittels Methotrexat dient ein modifiziertes Hamster-Minigen (Promoter mit kodierendem Bereich und dem ersten Intron) für Dihydrofolatreduktase (DHFR) als Selektionsmarker.

a) Herstellung der Vektor- und Promoteranteile durch PCR

Das Plasmid Bluescript SK+ wurde mit HindIII linearisiert und 5 ng DNA in einem 100 μ l PCR Ansatz eingesetzt (Reaktionspuffer: 50 mM KCl, 10 mM Tris-Cl pH=8,3, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% (w/v) Gelatine, 0,2 mM der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), 2,5 Einheiten Taq Polymerase pro 100 μ l). Als Primer wurden je 50 pmol der synthetischen Oligonukleotide EBI-1788 (5'-GGAATTCAGCCTGAATGGCGAATGGG-3'; bindet knapp außerhalb von M13 ori-Region in Bluescript Pos. 475, unabhängig von M13 ori-Orientierung) und EBI-1729 (5'-CCTCGAGCGTTGCTGGCGTTTTTCC-3'; bindet an Bluescript an Pos. 1195 vor ori, entspricht dem Anfang der Bluescript-Sequenz in pCDM8, 6 Basen 5' ergeben XhoI) eingesetzt. Nach 5 Minuten Denaturieren bei 94°C erfolgte die PCR über 20 Zyklen (40 sec bei 94°C, 45 sec bei 55°C, 5 Min bei 72°C, Perkin Elmer Cetus Thermal Cycler). Die Oligonukleotide flankieren die intergenische Region von M13 bzw. den Replikationsursprung (ori) mit dem dazwischenliegenden Gen für die β -Lactamase. Gleichzeitig wird am Ende des Replikationsursprungs eine XhoI- und am anderen Ende eine EcoRI-Schnittstelle erzeugt. Das Reaktionsgemisch wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform von Protein befreit und die DNA mit Ethanol präzipitiert. Die erhaltene DNA wurde mit XhoI und EcoRI geschnitten und nach Elektrophorese in einem Agarosegel ein Fragment mit 2,3 kb isoliert.

5 ng mit *SacII* linearisiertes Plasmid pCDM8 wurden mit den Oligonukleotiden EBI-1733 (5'-GGTCGACATTGATTATTGACTAG-3'; bindet an CMV-Promotorregion (Pos. 1542) von pCDM8, entspricht Pos.1 in pAD-CMV, *Sall*-Stelle für Klonierung) und EBI-1734 (5'-GGAATTCCTAGGAATACAGCGG-3'; bindet an Polyoma origin von 3' SV40 polyA-Region in pCDM8 (Pos. 3590)) unter identischen Bedingungen wie für Bluescript SK+ beschrieben, durch PCR amplifiziert. Die Oligonukleotide binden am Beginn der CMV-Promoter/Enhancer-Sequenz und erzeugen eine *Sall* Schnittstelle (EBI-1733) bzw. binden am Ende der SV40 poly-Adenylierungsstelle und erzeugen eine *EcoRI* Schnittstelle (EBI-1734). Das PCR-Produkt wurde mit *Sall* und *EcoRI* geschnitten und ein DNA Fragment von 1,8 kb aus einem Agarosegel isoliert.

Die beiden PCR Produkte wurden mit T4 DNA-Ligase ligiert, mit dem erhaltenen Ligationsprodukt *E.coli* HB101 transformiert und nach Standardmethoden Plasmid-DNA amplifiziert und präpariert. Das Plasmid der gewünschten Beschaffenheit (siehe Fig.3) wurde pCMV-M13 benannt.

Der SV40 Replikationsursprung (SV40 ori) wurde aus dem Plasmid pSV2gptDHFR20 (EP-A1 0321842) isoliert. Dazu wurde dieses Plasmid mit *HindIII* und *PvuII* doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch nachfolgende Behandlung mit dem großen Fragment der *E.coli* DNA Polymerase (Klenow Enzym) in Gegenwart der vier Desoxynukleotidtriphosphate stumpf gemacht. Ein dabei erhaltenes 0,38 kb DNA Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und in mit *EcoRI* linearisiertem pCMV-M13 ligiert. Ein nach Transformation von *E.coli* HB101 erhaltenes Plasmid mit dem SV40 ori in gleicher Orientierung wie das β -Lactamase Gen und dem CMV-Promoter wurde pCMV-SV40 benannt. Die Konstruktion dieses Plasmids ist in Fig.3 dargestellt.

20

b) Mutagenese des DHFR-Gens

Zur Herstellung eines Expressionsplasmids mit einer vielseitigen Multiklonierstelle wurden aus dem DHFR Minigen durch gerichtete Mutagenese zwei und durch Deletion drei Restriktionsenzymchnittstellen entfernt. Dazu wurde aus dem Plasmid pSV2gptDHFR20 ein 1,7 kb *BglII* Fragment, das die gesamte kodierende Region des Hamster DHFR-Gens enthält, in die *BglII* Stelle des Plasmids pUC219 (IBI) kloniert und das Plasmid pUCDHFR erhalten. Mit pUCDHFR transformierte *E.coli* JM109 (Stratagene) Zellen wurden mit etwa 40-fachem Überschuß des Helferphagen R408 (Stratagene) infiziert und 16 Stunden bei 37 °C in LB-Medium geschüttelt. Aus dem Bakterienüberstand wurde einzelsträngige Plasmid-DNA isoliert.

Die gerichtete Mutagenese erfolgte in zwei aufeinanderfolgenden Schritten, wobei das *in vitro* Mutagenese System RPN1523 (Amersham) verwendet wurde. Die am Beginn von Exon 2 befindliche *EcoRI* Stelle wurde durch Austausch einer Base von GAATTC zu GAGTTC zerstört. Dieser Basenaustausch führt zu keiner Änderung der kodierten Aminosäuresequenz und entspricht außerdem der Nukleotidsequenz im natürlichen murinen DHFR-Gen (McGrogan et al., 1985, Mitchell et al., 1986). Für die Mutagenese wurde ein Oligonukleotid (Antisense-Orientierung) der Sequenz 5'-GTACTTGAAGCTCGTTCCTG-3' (EBI-1751) verwendet. Ein Plasmid mit der gewünschten Mutation wurde, wie oben beschrieben, als Einzelstrang-DNA präpariert und die im ersten Intron befindliche *PstI* Stelle durch Mutagenese mit dem Oligonukleotid EBI-1857 (Antisense Orientierung, 5'-GGCAAGGGCAGCAGCCGG-3') von CTGCAG in CTGCTG entfernt. Die Mutationen wurden durch Sequenzierung bestätigt und das erhaltene Plasmid pUCDHFR-Mut2 benannt.

Aus dem Plasmid pUCDHFR-Mut2 wurde das 1,7 kb *BglII* Fragment isoliert und in mit *BglII* und *BamHI* doppelt geschnittenes Plasmid pSV2gptDHFR20 ligiert. Nach Transformation von *E.coli*, Amplifikation und DNA-Isolierung wurde ein Plasmid der gewünschten Beschaffenheit erhalten, das als pSV2gptDHFR-Mut2 bezeichnet wurde. Durch Schneiden mit *BamHI* wurde in der 3'-nicht-kodierenden Region des DHFR Gens ein auf die *BglII* Stelle folgendes 0,12 kb DNA-Fragment entfernt, das außerdem noch eine *KpnI* Schnittstelle enthält. Durch Verknüpfen der mit *BglII* und *BamHI* entstandenen überhängenden DNA-Enden wurden auch die Erkennungssequenzen für diese beiden Enzyme zerstört.

Das Plasmid pCMV-SV40 wurde mit *EcoRI* und *BamHI* doppelt geschnitten, die DNA-Enden nachfolgend mit Klenow-Enzym stumpf gemacht. Die DNA wurde durch Extraktion mit Phenol-Chloroform und Ethanol-fällung gereinigt, anschließend durch Inkubation mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert und die 4,4 kb lange Vektor DNA aus einem Agarosegel isoliert.

Das Plasmid pSV2gptDHFR-Mut2 (Fig.4) wurde mit *EcoRI* und *PstI* doppelt geschnitten und die DNA-Enden durch 20 Minuten Inkubation bei 11 °C mit 5 Einheiten T4 DNA-Polymerase (50 mM Tris-HCl pH=8,0, 5 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM jedes der vier Desoxynukleotidtriphosphate, 50 µg/ml Rinderserumalbumin) stumpf gemacht. Das 2,4 kb lange DNA-Fragment mit dem mutierten DHFR-Gen wurde aus einem Agarosegel isoliert und mit dem wie oben beschrieben präparierten pCMV-SV40 ligiert. Ein nach Transformation von *E.coli* erhaltenes Plasmid, das das DHFR-Gen in der selben Orientierung wie den CMV-Promoter enthielt, wurde pCMV-SV40DHFR benannt.

Im letzten Schritt wurde das 0,4kb "Stuffer"-Fragment nach dem CMV-Promoter, das noch aus dem Ausgangsplasmid pCDM8 stammte, gegen eine Multiklonierstelle ausgetauscht. Dazu wurde das Plasmid pCMV-SV40DHFR mit HindIII und XbaI doppelt geschnitten und der Vektoranteil aus einem Agarosegel isoliert. Die Multiklonierstelle, gebildet aus den beiden Oligonukleotiden EBI-1823 (5'-AGCTTCTGCAGGTCGACATCGATGGATCCGGTACCTCGAGCGGCCGCGAATTCT-3') und EBI-1829 (5'-CTAGAGAATTCGGCGCGCTCGAGGTACCGGATCCATCGATGTCGACCTGCAGA-3'), enthält inklusive der für die Klonierung in HindIII - XbaI kompatiblen Enden Restriktionsschnittstellen für die Enzyme PstI, SalI, ClaI, BamHI, KpnI, XhoI, NotI und EcoRI.

Je 1 µg der beiden Oligonukleotide wurden in 20 µl Reaktionspuffer (70 mM Tris-Cl pH=7,6, 10 mM MgCl₂, 5 mM Dithiothreitol, 0,1 mM ATP) mit 5 Einheiten T4 Polynukleotidkinase eine Stunde bei 37°C inkubiert, um die 5'-Enden zu phosphorylieren. Die Reaktion wurde durch 10 minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt und die komplementären Oligonukleotide miteinander hybridisiert, indem die Probe weitere 10 Minuten bei 56°C inkubiert und anschließend langsam auf Raumtemperatur abgekühlt wurde. 4 µl der hybridisierten Oligonukleotide (100 ng) wurden mit etwa 100 ng Plasmidvektor ligiert und E.coli HB101 transformiert. Ein Plasmid, das sich mit den Enzymen der Multiklonierstelle (ausgenommen NotI) linearisieren ließ, wurde pAD-CMV1 benannt. Von vielen getesteten Klonen konnte keiner identifiziert werden, dessen Plasmid sich mit NotI schneiden ließ. Die Sequenzierung zeigte immer die Deletion von einigen Basen innerhalb der NotI Erkennungssequenz.

In gleicher Weise wurde mit dem Oligonukleotidpaar EBI-1820 (5'-AGCTCTAGAGAATTCGGCGCGCTCGAGGTACCGGATCCATCGATGTCGACCTGCAGAAGCTTG-3') und EBI-1821 (5'-CTAGCAAGCTTCTGCAGGTCGACATCGATGGATCCGGTACCTCGAGCGGCCGCGAATTCTCTAG-3') das Expressionsplasmid pAD-CMV2 hergestellt, das die Restriktionsschnittstellen innerhalb der Multiklonierstelle in umgekehrter Reihenfolge enthält. Dabei wurde das Plasmid pAD-CMV2 erhalten, das sich mit sämtlichen Restriktionsenzymen, einschließlich NotI, linearisieren ließ.

Die Nukleotidsequenz des 6414 bp großen Plasmids pAD-CMV1 (Fig.5) ist zur Gänze in Fig.6 dargestellt.

Die Abschnitte auf dem Plasmid (angegeben in der Numerierung der Basen) entsprechen folgenden Sequenzen:

- 30 1- 21 EBI-1733, Beginn CMV Enhancer - Promotor (aus CDM8)
632-649 T7 Promotor
658-713 Multiklonierstelle (HindIII bis XbaI aus EBI-1823, EBI-1829)
714-1412 SV40 Intron und poly-Adenylierungsstelle (aus CDM8)
1413-2310 5' nicht kodierende Region und Promotor des Hamster DHFR Gen (aus pSV2gptDHFR20)
- 35 2311-2398 Hamster DHFR: Exon 1
2518 A zu T Mutation zerstört PstI Stelle in DHFR Intron 1
2701-3178 DHFR Exons 2-8 (kodierende Region)
2707 A zu G Mutation zerstört EcoRI Stelle
3272-3273 Deletion zwischen BglII und BamHI in DHFR 3' nicht kodierender Region
- 40 3831 Ende DHFR Gen (aus pSV2gptDHFR20)
3832-4169 SV40 ori (aus pSV2gptDHFR20)
4170-4848 M13 ori (aus pBluescript SK+)
4780-5840 β-Lactamase (kodierende Region)
6395-6414 EBI-1729, Ende der pBluescript Vektorsequenz

45 Die Herstellung der Plasmide pAD-CMV1 und pAD-CMV2 ist in Fig.5 dargestellt.

Beispiel 9

Konstruktion des Plasmids pADTNF-BP für die Expression der löslichen Form von TNF-BP

Um auf direktem Weg die sekretierte Form von TNF-BP herzustellen, wurde in der für einen Teil des TNF-Rezeptors kodierenden cDNA (vgl. Beispiel 7; im folgenden als TNF-R cDNA bezeichnet) nach dem Codon der C-terminalen Aminosäure des natürlichen TNF-BP (AAT, Asn-172; entspricht Pos.201 in Fig.9) ein Translationsstopcodon eingeführt. Dadurch wird die Proteinsynthese an dieser Stelle abgebrochen und ermöglicht, TNF-BP direkt in den Zellüberstand zu sekretieren, ohne eine nachfolgende, möglicherweise geschwindigkeitsbestimmende Reaktion einer proteolytischen Abspaltung in C-terminaler Richtung gelege-

ner Abschnitte des TNF-Rezeptors durchlaufen zu müssen.

Gleichzeitig mit der Einführung des Stopcodons mittels PCR wurde die 5'-nicht kodierende Region der TNF-R cDNA verkürzt, um das Translationsstartcodon eines weiteren offenen Leserähmens (Basen 72-203 in Fig.9), der sich 5' von dem des TNF-R befindet, zu entfernen, und am 5'-bzw. 3'-Ende der cDNA eine BamHI bzw. EcoRI Schnittstelle eingeführt.

100 ng mit XmnI linearisiertes Plasmid pTNF-BP15 (vgl. Beispiel 7), wurden mit je 50 pmol der Oligonukleotide EBI-1988 (Sense, 5'-CAGGATCCGAGTCTCAACCCTCAAC-3') und EBI-1929 (Antisense, 5'-GGGAATTCCTTATCAATTCTCAATCTGGGGTAGGCACAACCTC-3'; Einführung zweier Stop-Codons und einer EcoRI Stelle) in einem 100 µl PCR-Ansatz über 10 Zyklen amplifiziert. Die Zyklusbedingungen waren 40 Sekunden bei 94°C, 45 Sekunden bei 55°C und 5 Minuten bei 72°C. Nach dem letzten Zyklus wurde für weitere 7 Minuten bei 72°C inkubiert und die Reaktion durch Extraktion mit Phenol-Chloroform gestoppt. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert und anschließend mit BamHI und EcoRI doppelt geschnitten. Das entstandene 0,75 kb DNA Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert und in mit BamHI und EcoRI doppelt geschnittenes Plasmid pT7/T3α-19 (BRL) kloniert. Eines der erhaltenen Plasmide, von dem aufgrund der Sequenzierung des gesamten Inserts festgestellt worden war, daß es die gewünschte Sequenz aufwies, wurde pTNF-BP benannt.

pTNF-BP wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und das 0,75 kb DNA Insert in das mit BamHI und EcoRI geschnittene Expressionsplasmid pAD-CMV1 kloniert. Ein erhaltenes Plasmid der gewünschten Zusammensetzung wurde pADTNF-BP benannt (Fig.7A).

Beispiel 10

25 Konstruktion des Plasmides pADTNF-BP für die Expression der löslichen Form von TNF-BP

Für eine weitere Variante eines Expressionsplasmides für die Produktion von sekretiertem TNF-BP wurde die 5'-nicht kodierende Region der TNF-R cDNA gegen die 5'-nicht kodierende Region der humanen β-Globin mRNA ausgetauscht. Der Grund dafür war die Feststellung, daß die Nukleotidsequenz unmittelbar vor dem Translationsstartcodon der TNF-R Sequenz deutlich von der für effiziente Expression eukaryotischer Gene gefundenen Konsensussequenz (Kozak,1987) abweicht, wogegen die 5'-nicht kodierende Region der β-Globin mRNA sehr gut mit dieser Konsensussequenz übereinstimmt (Lawn et al., 1980). Mittels des Oligonukleotids EBI-2452 (5'-CACAGTCGACTTACATTGCTTCTGACACAACCTGTGTTCACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGGCCTCTCCACCGTGC-3'), das nach einer Sall Restriktionsschnittstelle die authentische 5'-nicht kodierende Sequenz, entsprechend der humanen β-Globin mRNA-Sequenz, gefolgt von 20 Basen der kodierenden Region von TNF-BP enthielt, wurde in einer PCR die TNF-R Sequenz modifiziert. 100 ng mit EcoRI linearisiertes Plasmid pTNF-BP wurden in 100 µl Reaktionsansatz mit je 50 pmol der Oligonukleotide EBI-2452 und EBI-1922 (Antisense, 5'-GAGGCTGCAATTGAAGC-3'; bindet an die huTNF-R Sequenz bei Pos. 656) in 20 PCR-Zyklen (40 sec bei 94°C, 45 sec bei 55°C, 90 sec bei 72°C) amplifiziert. Nach Reinigung des PCR-Produktes durch Extraktion mit Phenol-Chloroform und Ethanol-fällung wurde die DNA mit Sall und BglII doppelt geschnitten und das entstandene 0,51 kb DNA Fragment aus einem Agarosegel isoliert. Der entsprechende Teil der TNF-R Sequenz wurde aus dem Plasmid pTNF-BP durch Schneiden mit Sall und BglII entfernt, der 3,1 kb lange Plasmidteil aus einem Agarosegel isoliert und mit dem 0,51 kb langen PCR-Produkt ligiert. Nach Transformation von E.coli wurden sieben der erhaltenen Plasmide sequenziert. Eines dieser Plasmide enthielt genau die gewünschte Sequenz. Dieses Plasmid wurde pBTNF-BP benannt.

Das gesamte Sall - EcoRI Insert von pBTNF-BP wurde in das ebenso geschnittene Expressionsplasmid pAD-CMV1 kloniert und das erhaltene Plasmid pADBTNF-BP benannt (Fig.7B).

Beispiel 11

Isolierung von Ratten TNF-R cDNA Klonen

Zunächst wurde eine Rattenhirn-cDNA analog der HS913T cDNA Bibliothek (vgl. Beispiel 4) aus der Ratten Gliä Tumor Zelllinie C8 (ATCC Nr. CCL107) in λ-gt11 hergestellt. 600.000 Phagen der Rattenhirn cDNA Bibliothek in λ-gt11 wurden, wie in Beispiel 6 beschrieben, durch

Hybridisierung gescreent. Als Sonde wurde das gereinigte EcoRI Insert von pTNF-BP30 (vgl. Beispiel 6) verwendet. Etwa 100 ng DNA wurden mit 1 µg Random Hexamer Primer anstatt der spezifischen Oligonukleotide, wie in Beispiel 6 beschrieben, mit [α - 32 P]dCTP radioaktiv markiert. Eingebaut wurden 25x10⁶ cpm. Die Hybridisierung der Filter erfolgte unter gleichen Bedingungen wie in Beispiel 6. Die Filter wurden zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSC/0,1% SDS und dreimal 30 Minuten bei 65 °C in 2xSSC/0,1% SDS und zweimal 30 Minuten bei 65 °C in 0,5xSSC/0,5% SDS gewaschen. Die luftgetrockneten Filter wurden anschließend an Kodak XAR Röntgenfilm 18 Stunden unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70 °C exponiert. Insgesamt wurden 10 hybridisierende Plaques identifiziert und durch Plaquareinigung vereinzelt. Nach dreimaliger Plaquareinigung wurden schließlich drei λ -Klone (λ -raTNF-R #3, 4, 8) vereinzelt und die Phagen DNA, wie beschrieben, dargestellt.

Die Länge der cDNA Inserts wurde nach Schneiden der λ -DNA mit EcoRI und Auftrennung in einem Agarosegel mit 2,2 kb für die Klone raTNF-R3 und raTNF-R8 und 2,1 kb für Klon raTNF-R4 bestimmt. Die EcoRI Inserts der Klone λ raTNF-R3 und 8 wurden in ebenso geschnittenen M13mp19 kloniert und die DNA Sequenz mit universellen Sequenzierprimern und spezifisch synthetisierten Oligonukleotidprimern bestimmt.

Die vollständige Nukleotidsequenz von raTNF-R8 ist in Fig.8 dargestellt. Die ersten und letzten sieben Basen entsprechen den EcoRI-Linkern, die bei der Herstellung der cDNA-Bibliothek angefügt worden waren.

Beispiel 12

Isolierung eines Klon, enthaltend die vollständige für den humanen TNF-Rezeptor kodierende cDNA

Die vollständige cDNA des Ratten TNF-R erleichterte die Suche nach dem noch fehlenden 3'-Teil der humanen TNF-R cDNA.

Als Sonde für die Hybridisierung wurde das 0,4 kb lange PCR-Produkt der Primer EBI-2316 (5'-ATTCGTGCGGCGCCTAG-3'; bindet an TNF-R mit 2.Base von EcoRI, an der TNF-R cDNA abbricht) und EBI-2467 (5'-GTCGGTAGCACCAAGGA-3'; bindet ca. 400 Basen vor poly-A an cDNA-Klon, entspricht Pos. 1775 in raTNF-R) mit λ raTNF-R8 als Vorlage eingesetzt. Dieses DNA Fragment entspricht der Region der Ratten TNF-R cDNA, von der angenommen wurde, daß sie der, welche der internen EcoRI Stelle im humanen TNF-R folgt, entspricht.

2,5x10⁶ cpm der raTNF-R Sonde wurden eingesetzt, um 600.000 Plaques der HS913T cDNA-Bibliothek zu hybridisieren. Die Hybridisierungsbedingungen entsprachen den in Beispiel 6 angegebenen. Die Filter wurden zweimal 30 Minuten bei Raumtemperatur in 2xSSC/0,1% SDS und zweimal 30 Minuten bei 65 °C in 2xSSC/0,1% SDS gewaschen, an der Luft getrocknet und an Kodak XAR Röntgenfilm unter Verwendung einer Verstärkerfolie 3 Tage bei -70 °C exponiert. Sechs positive Plaques wurden identifiziert, in zwei weiteren Runden Plaques gereinigt und λ -DNA dargestellt (λ -TNF-R #2, 5, 6, 8, 11, 12). Nach Schneiden der λ -DNA mit EcoRI wiesen alle Klone eine DNA Bande mit etwa 0,8 kb Länge auf. λ TNF-R2 und 11 enthielten zusätzlich ein EcoRI Fragment mit 1,3 kb. Die beiden EcoRI Inserts aus λ TNF-R2 wurden in die EcoRI Stelle von Plasmid pUC218 (IBI) subkloniert und anschließend sequenziert. Die Sequenz des 1,3 kb EcoRI Fragments entsprach der von cDNA Klon pTNF-BP15, das 0,8 kb EcoRI Fragment entspricht dem 3'-Abschnitt der TNF-R mRNA und enthält vor der EcoRI-Linker Sequenz einen poly-A Schwanz mit 18 A Resten. λ TNF-R2 enthält demnach die vollständige kodierende Region des humanen TNF-R, dargestellt in Fig.9.

Beispiel 13

Konstruktion der Plasmide pADTNF-R und pADBTNF-R für die Expression des gesamten humanen TNF-Rezeptors

Zunächst wurde, ähnlich wie im Beispiel 9 für pTNF-BP bzw. pADTNF-BP beschrieben, ein Plasmid konstruiert, in dem die 5'-nicht kodierende Region von pTNF-BP15 verkürzt, im Unterschied zu den im Beispiel 9 beschriebenen Plasmiden jedoch das 3'-Ende von pTNF-BP15 beibehalten wurde. Dazu wurde unter identischen Bedingungen wie in Beispiel 9 mit dem Oligonukleotid EBI-1988 und dem M13 -40 Universalprimer (5'-GTTTCCAGTCACGAC-3') pTNF-BP15 mit PCR amplifiziert. Das PCR Produkt wurde mit BamHI und EcoRI doppelt geschnitten und in das Plasmid pT7/T3a-19 kloniert. Eines der erhaltenen

Plasmide wurde pTNF-BP15B benannt.

pTNF-BP15B wurde mit BamHI und EcoRI geschnitten und das 1,26 kb DNA Insert in mit BamHI und EcoRI geschnittenes Expressionsplasmid pAD-CMV1 kloniert. Ein erhaltenes Plasmid der gewünschten Zusammensetzung wurde pADTNF-BP15 benannt.

Dieses Plasmid wurde mit EcoRI linearisiert und in die Schnittstelle das 0,8 kb EcoRI Fragment, isoliert aus λ TNF-R2, kloniert. Nach Transformation von E.coli wurden einige wahllos isolierte Plasmide durch Schneiden mit verschiedenen Restriktionsenzymen auf die korrekte Orientierung des eingesetzten EcoRI Fragments überprüft. Ein Plasmid, bezeichnet als pADTNF-R (Fig.7C), wurde noch genauer auf korrekte Orientierung untersucht, indem das Insert ausgehend vom 3'-Ende der insertierten cDNA mit dem Oligonukleotid EBI-2112 (5'-GTCCAATTATGTCACACC-3'), das nach der Multiklonierstelle an das Plasmid pAD-CMV1 und seine Derivate bindet, sequenziert wurde.

Ein weiteres Expressionsplasmid, in dem die 5'-nicht kodierende Region des TNF-R gegen die von β -Globin ausgetauscht ist, wurde konstruiert. Plasmid pADBTNF-BP wurde mit BglII vollständig geschnitten, um das 1,1 kb BglII Fragment zu entfernen, die DNA-Enden wurden nachfolgend mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert und der Plasmidvektor (5,9 kb) mit der β -Globin 5'-nicht kodierenden Region des β -Globingens und dem 5'-Teil der TNF-R kodierenden Region aus einem Agarosegel isoliert. Plasmid pADTNF-R wurde mit BglII geschnitten und das 2,5 kb DNA Fragment, enthaltend den 3'-Abschnitt der TNF-R cDNA bis zur Promoterregion des nachfolgenden DHFR-Gens, aus einem Agarosegel isoliert und in den zuvor präparierten Plasmidvektor kloniert. Ein nach Transformation von E.coli erhaltenes Plasmid mit dem in korrekter Orientierung insertierten BglII-Fragment wurde pADBTNF-R benannt (Fig.7D).

Beispiel 14

Expression von löslichem TNF-BP in eukaryotischen Zelllinien

a) ELISA-Test

In diesem Beispiel wurde der Nachweis von TNF-BP mittels ELISA-Test wie folgt durchgeführt:

96-Napf Mikrotiterplatten wurden pro Napf mit 50 μ l 1:3000 verdünntem polyklonalem Kaninchen-Serum (polyklonales Kaninchenantikörper, hergestellt durch Präzipitation von Antiserum mit Ammoniumsulfat, Endkonzentration 50 % Sättigung) gegen natürliches TNF-BP 18 Stunden bei 4 °C beschichtet, einmal mit 0,05% Tween-20 in PBS gewaschen und freie Bindungsstellen mit 150-200 μ l 0,5% Rinderserumalbumin, 0,05% Tween-20 in PBS (PBS/BSS/Tween) eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Die Näpfe wurden einmal mit 0,05% Tween-20 in PBS gewaschen und 50 μ l Zellüberstand oder bekannte Mengen von natürlichem TNF-BP (vgl. Tab.3 und 4) und 50 μ l einer 1:10.000-fachen Verdünnung eines polyklonalen Mäuseserums gegen TNF-BP aufgetragen und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Näpfe dreimal mit 0,05% Tween-20 in PBS gewaschen und 50 μ l Kaninchen anti-Maus Ig-Peroxidase Konjugat (Dako P181; 1:5000 in PBS/BSA/Tween), zugegeben und weitere zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die Näpfe wurden dreimal mit Tween/PBS gewaschen und die Färbereaktion mit Orthophenyldiamin (3 mg/ml) und Na-Perborat (1 mg/ml) in 0,067M Kalium-Citrat pH 5,0, 100 μ l/Napf, 20 Minuten bei Raumtemperatur unter Lichtschutz durchgeführt. Nach Zugabe von 100 μ l 4N H₂SO₄ wurde die Farbintensität bei einer Wellenlänge von 492 nm in einer Mikrofilmpalten-Photometer photometrisch gemessen.

b) Transiente Expression von löslichem TNF-BP in eukaryotischen Zelllinien

Etwa 10⁶ Zellen (COS-7) pro 80 mm Petrischale wurden 24 Stunden vor der Transfektion in RPMI-1640 Medium mit 10% hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum angesetzt und bei 37 °C in 5% CO₂ Atmosphäre inkubiert. Die Zellen wurden mit einem Gummischaber von der Petrischale gelöst und 5 Minuten bei 1200 UpM bei Raumtemperatur abzentrifugiert (Heraeus Minifuge, Ausschwing-Rotor 3360), einmal mit 5 ml serumfreiem Medium gewaschen, 5 Minuten bei 1200 UpM zentrifugiert und in 1 ml Medium, versetzt mit 250 μ g/ml DEAE-Dextran und 10 μ g Plasmid DNA (vgl. Tab.3, gereinigt durch zweimalige CsCl Dichtegradientenzentrifugation) suspendiert. Die Zellen wurden 40 Minuten bei 37 °C inkubiert, einmal mit 5 ml Medium mit 10% Kälberserum gewaschen und in 5 ml Medium mit 100 μ g/ml Chloroquin suspendiert. Die

Zellen wurden eine Stunde bei 37 °C inkubiert, einmal mit Medium gewaschen und mit 10 ml frischem Medium bei 37 °C inkubiert. Nach 72 Stunden wurde der Zellüberstand geerntet und zum Nachweis des sekretierten TNF-BP verwendet.

Tabelle 3:

Zelllinie	COS-7
ohne Plasmid	< 5 ng/ml
pADTNF-BP	7,5 ng/ml
pADBTNF-BP	148 ng/ml

c) Herstellung permanent TNF-BP produzierender Zelllinien

Die Dihydrofolatreduktase(DHFR)-defiziente Hamster Ovarial Zelllinie CHO DUKX BII (Urlaub und Chasin, 1980) wurde mit Plasmid pADBTNF-BP mittels Kalzium-Phosphat Präzipitation transfiziert (Current protocols in molecular biology, 1987). Vier dicht bewachsene Zellkultur-Fläschchen (25 cm², 5 ml Kulturmedium pro Fläschchen) wurden mit je 5 µg DNA transfiziert; nach vierstündiger Inkubation bei 37 °C wurde das Medium entfernt und durch je 5 ml Selektionsmedium (MEM alpha Medium mit 10 % dialysiertem fötalem Rinderserum) ersetzt. Nach Inkubation über Nacht wurden die Zellen mittels Trypsin-Lösung abgelöst; die Zellen aus jedem Fläschchen wurden in zwei 96-Näpf Gewebekulturplatten aufgeteilt (100 µl/Napf in Selektionsmedium). In etwa wöchentlichen Abständen wurde frisches Medium zugegeben. Nach etwa vier Wochen konnten in 79 Näpfen Zellklone beobachtet werden. Die Überstände wurden im ELISA auf TNF-BP Aktivität getestet. 37 Überstände zeigten Aktivität im ELISA. Die Ergebnisse des ELISA-Tests einiger positiver Klone ist in Tab.4 dargestellt.

Tabelle 4:

Probe	Absorption bei 492 nm	
TNF-BP Standard		
1 ng/ml	0,390	
10 ng/ml	1,233	
100 ng/ml	1,875	
Kulturmedium (Negativkontrolle)		0,085
Klon		
A1G3	0,468	
A2F5	0,931	
A3A12	0,924	
A4B8	0,356	
A5A12	0,808	
A5B10	0,915	
A5C1	0,966	

Beispiel 15:

RNA Analyse (Northern Blot) des humanen TNF-Rezeptors

Je 1 µg poly-A⁺ RNA (Isoliert aus HS913T (Fibrosarkom), Plazenta und Milz) wurden in einem 1,5%igen vertikalen Agarosegel (10mM Na-Phosphatpuffer pH=7,0, 6,7 % Formaldehyd) elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurde eine durch Einfüllreaktion mit (α-³²P)dCTP und Klenow-Enzym radioaktiv markierte Kilobasenleiter (Bethesda Research Laboratories) verwendet. Das Formaldehyd wurde durch Wässern aus dem Gel entfernt und die RNA in 20x SSC auf eine Nylon-Membran (Genescreen plus, NEN-DuPont) transferiert. Die RNA wurde durch UV-Bestrahlung (100 Sekunden) auf der Membran kovalent gebunden. Die Membran wurde 2 Stunden bei 85°C in Church-Puffer (Church and Gilbert, 1984), (0,5 M Na-Phosphat pH=7,2, 7 % SDS, 1 mM EDTA) prähybridisiert und 19 Stunden bei 65°C in frischem Church-Puffer mit 3x10⁶ cpm P-32 markierter DNA Sonde (EcoRI Insert von pTNF-BP30) hybridisiert. Das Filter wurde dreimal 10 Minuten bei Raumtemperatur in Waschpuffer (40 mM Na-Phosphat pH=7,2, 1 % SDS) und anschließend viermal 30 Minuten bei 65°C in Waschpuffer gewaschen und 18 Stunden auf Kodak XAR Röntgenfilm unter Verwendung einer Verstärkerfolie bei -70°C exponiert.

Das Autoradiogramm (Fig.10) zeigt eine singuläre RNA Bande einer Länge von 2,3 kb für den humanen TNF-Rezeptor in den analysierten Geweben bzw. der Zelllinie HS913T.

Beispiel 16:

Expression des TNF-Rezeptors

Für die transiente Expression wurden 5 - 10x10⁷ COS-7 Zellen 40 Minuten lang mit 10 µg pADTNF-R-Plasmid-DNA in einer Lösung enthaltend 250 µg/ml DEAE Dextran und 50 µg/ml Chloroquin inkubiert. Als Kontrolle wurde pADCMV-1-DNA verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen gewaschen und anschließend 48 h lang gezüchtet. Die Expression des TNF-Rezeptors wurde durch Bindung von ¹²⁵I-TNF nachgewiesen. Für die Bindungstests wurden die Zellen gewaschen, 1 h lang bei 4°C mit 10 ng ¹²⁵I-TNF (spezifische Radioaktivität 38.000 cpm/ng) mit oder ohne 200fachen Überschuß an unmarkiertem TNF inkubiert, gewaschen, und die an die Zellen gebundene Radioaktivität in einem Gamma-Zähler gemessen. Die spezifische Bindung betrug bei der Kontrollprobe 2062 cpm, bei den mit TNF-Rezeptor DNA transfizierten Proben 6150 cpm (die Werte sind ausgedrückt als mittlere gebundene cpm; die Standardabweichung, bestimmt aus Parallelversuchen, ist berücksichtigt. Unspezifischer Untergrund in Anwesenheit von unmarkiertem TNF wurde von den Werten abgezogen).

Literatur:

- Aggarwal, B.B., et al., 1985, Nature 318, 655-667
- Beutler B., et al., 1988, Ann. Rev. Biochem. 57, 505-18
- Beutler, B., et al., 1985, Nature 316, 552 - 554
- Boshart, M., et al., 1985, Cell 41, 521-530
- Carswell, E.A., et al., 1975, Proc.Natl.Acad.Sci.25, 3686-3670
- Cerami, A., et al., 1988, Immunol. Today 9, 28-31
- Church und Gilbert, 1984, Proc.Natl.Acad.Sci. 81, 1991-1995
- Creasey, A.A., et al., 1987, Proc.Natl.Acad.Sci. 84, 3293-3297
- Engelmann, H., et al., 1990, J.Biol.Chem.265, 1531-1538
- Frohman, M.A., et al., 1988, Proc.Natl.Acad.Sci. 85, 8998-9002
- Gullberg, U., et al., 1987, Eur. J. Haematol. 39, 241-251
- Hsieng, S.L., et al., 1988, J. Chromatography 447, 351-384
- Klebanoff, S.J., et al., 1986, J. Immunol. 136, 4220-4225
- Kozak M., 1987, Nucleic Acids Res. 15, 8125-8148
- Laemmli, U.K., 1970, Nature 227, 680-4
- Lawn, et al., 1980, Cell 21, 847-851
- Locksley, R.M., et al. 1987, J.Immunol. 139, 1891-1895
- Mahoney, J.R., et al., 1985, J. Immunol. 134, 1673-1675
- Maniatis, T., et al., 1982, Molecular Cloning A laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, 474
- McGrogan, M., et al., 1985, J.Biol.Chem. 260, 2307-2314

- Mestan, J., et al., 1986, Nature 323, 816-819
 Mitchell, P.J., et al., 1988, Mol.Cell.Biol. 8, 425-440
 Oakley, B.R., et al., 1986, Analyt. Biochem. 105, 381-383
 Old, L.J., 1987, Nature 326, 330-331
 Oliff A., et al., 1987, Cell 555-63
 Olsson I., et al., 1988, Eur.J. Haematol. 41, 414 - 420
 Olsson I., et al., 1989, Eur.J. Haematol. 42, 270 - 275
 Pieler Ch., 1987, Dissertation, Universität Wien
 Piguet, P.F., et al., 1987, Immunobiol. 175, 27
 Saiki, R.K., 1988, Science 239, 487-491
 Sanger et al., 1977, Proc.Natl.Acad.Sci. 74, 5483-5487
 Seckinger P., et al., 1988, J. Exp. Med., 1511-16
 Seckinger, P., et al., 1987, J. Immunol. 139, 1546-1549
 Seed und Aruffo, 1987, Proc.Natl.Acad.Sci. 84, 8573-8577
 Seed, B., 1987, Nature 329, 840-842
 Shalaby, M.R., et al., 1985, J. Immunol. 135, 2069-2073
 Short, J.M., et al., 1988, Nucl.Acids Res.11, 5521-5540
 Staden, R., 1982, Nucleic Acid Res. 10, 4731-4751
 Stauber, G.B., et al., 1988, J.Biolog.Chem. 35, Vol.263, 19098-19104
 Stauber, G.B., et al., 1989, J.Biolog.Chem. 8, Vol.264, 3573-3576
 Torti, F.M. et al., 1985, Nature 229:867-869
 Tracey, K.J., et al., 1987, Nature 330, 862-868
 Tracey, K.J., et al., 1988, Science 234, 470-474
 Urlaub und Chasin, 1980, Proc.Natl.Acad.Sci. 77, 4216-4220
 Waage, A., et al., 1987, Lancet. ii, 355-357
 Wong, G.H.W., et al., 1988, Nature 323, 819-822

Ansprüche

1. DNA, kodierend für einen TNF-Rezeptor oder für Fragmente davon, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel

ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG
 GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA
 GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC
 AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC
 TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC
 AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC
 CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT
 TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG GAG
 AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC
 TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC CTA CCC CAG ATT GAG
 AAT GTT AAG GGC ACT GAG GAC TCA GGC ACC ACA GTG CTG TTG CCC CTG GTC ATT TTC TTT
 GGT CTT TGC CTT TTA TCC CTC CTC TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG
 TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA CCT GAA AAA GAG GGG GAG CTT GAA
 GGA ACT ACT ACT AAG CCC CTG GCC CCA AAC CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC TTC ACC
 CCC ACC CTG GGC TTC AGT CCC GTG CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC
 CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA GAG GTG GCA CCA CCC TAT CAG GGG
 GCT GAC CCC ATC CTT GCG ACA GCC CTC GCC TCC GAC CCC ATC CCC AAC CCC CTT CAG AAG
 TGG GAG GAC AGC GCC CAC AAG CCA CAG AGC CTA GAC ACT GAT GAC CCC GCG ACG CTG TAC
 GCC GTG GTG GAG AAC GTG CCC CCG TTG CGC TGG AAG GAA TTC GTG CGG CGC CTA GGG
 CTG AGC GAC CAC GAG ATC GAT CGG CTG GAG CTG CAG AAC GGG CGC TGC CTG CGC GAG
 GCG CAA TAC AGC ATG CTG GCG ACC TGG AGG CGG CGC ACG CCG CGC GAG GCC ACG
 CTG GAG CTG CTG GGA CGC GTG CTC CGC GAC ATG GAC CTG CTG GGC TGC CTG GAG GAC ATC
 GAG GAG GCG CTT TGC GGC CCC GCC GCC CTC CCG CCC GCG CCC AGT CTT CTC AGA TGA

oder Abschnitte davon aufweist, einschließlich ihrer degenerierten Varianten.

2. DNA nach Anspruch 1, kodierend für sekretierbares TNF-binderndes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Formel

R³ GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC
 CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC AAG TGC CAC
 AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG
 GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC
 TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC
 CTC AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG
 GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC CGG GAC ACC
 GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT
 TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC
 CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG
 GAG AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT
 TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC TCC TGT AGT
 AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC
 CTA CCC CAG ATT GAG AAT

aufweist, wobei R² gegebenenfalls fehlt oder eine für ein in vivo abspaltbares (Poly)peptid kodierende DNA darstellt, einschließlich ihrer degenerierten Varianten.

3. DNA nach Anspruch 2, kodierend für sekretierbares TNF bindendes Protein, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in Anspruch 2 definierte Formel aufweist, wobei R² eine zur Gänze oder teilweise für eine Signalsequenz kodierende DNA darstellt.

4. DNA nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß R² die Formel CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA aufweist.

5. DNA nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß R² für R³ CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA steht, wobei R³ eine für ein Signalpeptid kodierende DNA darstellt.

6. DNA nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß R³ für ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA steht.

7. Nukleinsäuren, dadurch gekennzeichnet, daß sie mit der im Anspruch 1 definierten DNA oder Abschnitten davon unter Bedingungen niedriger Stringenz hybridisieren und für ein Polypeptid mit der Fähigkeit, TNF zu binden, kodieren oder die für ein solches Polypeptid kodierende Sequenz enthalten.

8. Rekombinantes DNA-Molekül, dadurch gekennzeichnet, daß es die in Anspruch 1 definierte DNA-Sequenz oder eine degenerierte Variante oder mindestens ein Fragment davon enthält.

9. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 8, replizierbar in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß es, funktionell verbunden mit der in Anspruch 2 definierten DNA-Sequenz oder einer degenerierten Variante oder mindestens einem Fragment davon, Expressionskontrollsequenzen enthält.

10. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 9, replizierbar in Säugetierzellen.

11. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß es eine in einem der Ansprüche 2 bis 6 definierte DNA enthält.

12. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß es die in Anspruch 6 definierte DNA enthält.

13. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 12 mit der Bezeichnung pADTNF-BP.

14. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 12 mit der Bezeichnung pADBTNF-BP.

15. Rekombinantes DNA-Molekül, replizierbar in prokaryotischen oder eukaryotischen Wirtsorganismen, dadurch gekennzeichnet, daß es eine in Anspruch 1 definierte, gegebenenfalls modifizierte, DNA oder mindestens ein Fragment davon enthält.

16. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 15, replizierbar in Säugetierzellen.

17. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 16 mit der Bezeichnung pADTNF-R.

18. Rekombinantes DNA-Molekül nach Anspruch 16 mit der Bezeichnung pADBTNF-R.

19. Wirtsorganismus, transformiert mit mindestens einem der in den Ansprüchen 11 bis 14 definierten

rekombinanten DNA-Moleküle.

20. Wirtsorganismus, transformiert mit einem in den Ansprüchen 15 bis 18 definierten rekombinanten DNA-Molekül.

21. Rekombinantes Polypeptid, dadurch gekennzeichnet, daß es von einer in Anspruch 1 definierten DNA kodiert wird.

22. Polypeptid nach Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, daß es der TNF-Rezeptor der Formel
 met gly leu ser thr val pro asp leu leu leu pro leu val leu leu glu leu val gly ile tyr pro ser gly val ile gly
 leu val pro his leu gly asp arg glu lys arg asp ser val cys pro gln gly lys tyr ile his pro gln asn asn ser ile
 cys cys thr lys cys his lys gly thr tyr leu tyr asn asp cys pro gly pro gly gln asp thr asp cys arg glu cys glu
 10 ser gly ser phe thr ala ser glu asn his leu arg his cys leu ser cys ser lys cys arg lys glu met gly gln val glu
 ile ser ser cys thr val asp arg thr val cys gly cys arg lys asn gln tyr arg his tyr trp ser glu asn leu phe
 gln cys phe asn cys ser leu cys leu asn gly thr val his leu ser cys gln glu lys gln asn thr val cys thr cys his
 ala gly phe phe leu arg glu asn glu cys val ser cys ser asn cys lys lys ser leu glu cys thr lys leu cys leu
 pro gln ile glu asn val lys gly thr glu asp ser gly thr thr val leu leu pro leu val ile phe phe gly leu cys leu leu
 15 ser leu leu phe ile gly leu met tyr arg tyr gln arg trp lys ser lys leu tyr ser ile val cys gly lys ser thr pro glu
 lys glu gly glu leu glu gly thr thr thr lys pro leu ala pro asn pro ser phe ser pro thr pro gly phe thr pro thr
 leu gly phe ser pro val pro ser ser thr phe thr ser ser ser thr tyr thr pro gly asp cys pro asn phe ala ala pro
 arg arg glu val ala pro pro tyr gln gly ala asp pro ile leu ala thr ala leu ala ser asp pro ile pro asn pro leu gln
 lys trp glu asp ser ala his lys pro gln ser leu asp thr asp asp pro ala thr leu tyr ala val val glu asn val pro
 20 pro leu arg trp lys glu phe val arg arg leu gly leu ser asp his glu ile asp arg leu glu leu gln asn gly arg cys
 leu arg glu ala gln tyr ser met leu ala thr trp arg arg thr pro arg arg glu ala thr leu glu leu leu gly arg val
 leu arg asp met asp leu leu gly cys leu glu asp ile glu glu ala leu cys gly pro ala ala leu pro pro ala pro ser
 leu leu arg

oder ein Polypeptid bestehend aus mindestens einem Fragment davon ist.

23. Polypeptid nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß es TNF bindendes Protein der Formel
 asp ser val cys pro gln gly lys tyr ile his pro gln asn asn ser ile cys cys thr lys cys his lys gly thr tyr leu tyr
 asn asp cys pro gly pro gly gln asp thr asp cys arg glu cys glu ser gly ser phe thr ala ser glu asn his leu
 arg his cys leu ser cys ser lys cys arg lys glu met gly gln val glu ile ser ser cys thr val asp arg asp thr val
 30 cys gly cys arg lys asn gln tyr arg his tyr trp ser glu asn leu phe gln cys phe asn cys ser leu cys leu asn
 gly thr val his leu ser cys gln glu lys gln asn thr val cys thr cys his ala gly phe phe leu arg glu asn glu cys
 val ser cys ser asn cys lys lys ser leu glu cys thr lys leu cys leu pro gln ile glu asn
 oder ein funktionelles Fragment oder Derivat mit der Fähigkeit, TNF zu binden, ist.

24. Verfahren zur Herstellung eines Polypeptids nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß ein in
 Anspruch 19 definierter Wirtsorganismus gezüchtet und das exprimierte Protein isoliert wird.

25. Verfahren zur Herstellung von rekombinanten TNF-Rezeptor oder Fragmenten oder Modifikationen
 35 davon, dadurch gekennzeichnet, daß ein in Anspruch 20 definierter Wirtsorganismus gezüchtet und das
 exprimierte Protein isoliert wird.

26. Verwendung eines in den Ansprüchen 21 und 22 definierten Polypeptids zum Untersuchen von
 Substanzen auf ihre Wechselwirkung mit diesem Polypeptid und/oder mit TNF- α und/oder mit TNF- β
 40 und/oder auf ihre Beeinflussung der biologischen Wirkung von TNF- α und/oder TNF- β .

27. Verwendung eines in Anspruch 20 definierten Wirtsorganismus zum Untersuchen von Substanzen
 auf ihre Wechselwirkung mit dem TNF-Rezeptor und/oder ihre Beeinflussung der biologischen Wirkung von
 TNF- α und/oder TNF- β .

28. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 23 zur prophylaktischen oder therapeutischen
 45 Behandlung des menschlichen Körpers bei Indikationen, bei denen eine schädigende Wirkung von TNF- α
 und/oder TNF- β auftritt.

29. Verwendung eines Polypeptids nach Anspruch 23 als Diagnostikum zur Bestimmung von TNF- α
 und/oder TNF- β .

30. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, daß sie als therapeutisch wirksame Kompo-
 50 nente ein in Anspruch 23 definiertes Polypeptid in einer Menge enthält, die die biologische Wirkung von
 TNF- α und/oder TNF- β wirksam inhibiert.

Fig.1/1

GAATTCTCTGGACTGAGGCTCCAGTTCTGGCCTTTGGGG

TTCAAGATCACTGGGACCAGGCCGTGATCTCTATGCCCCGAGTCTCAACCCTCAACTGTC

ACCCCAAGGCACTTGGGACGTCCTGGACAGACCGAGTCCCGGGAAGCCCCAGCACTGCC

GCTGCCACACTGCCCTGAGCCCAAATGGGGGAGTGAGAGGCCA TAG CTG TCT GGC

S1	S5	S10	S15
Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu			
ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC			
216	225	234	243
			252
	S20	S25	S29
Leu Glu Leu Leu Val Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu			1
CTG GAG CTG TTG GTG GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG			
261	270	279	288
			297
	5	10	15
Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg Asp Ser Val Cys Pro			
GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA GAT AGT GTG TGT CCC			
306	315	324	333
			342
	20	25	30
Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr			
CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC			
351	360	369	378
			387
	35	40	45
Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro			
AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG			
396	405	414	423
			432
	50	55	60
Gly Gln Asp Thr Asp Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr			
GGG CAG GAT ACG GAC TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC			
441	450	459	468
			477
	65	70	75
Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu Ser Cys Ser Lys Cys			
GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC AGC TGC TCC AAA TGC			
486	495	504	513
			522
	80	85	90
Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp			
CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC			
531	540	549	558
			567
	95	100	105
Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr			
CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT			
576	585	594	603
			612
	110	115	120
Trp Ser Glu Asn Leu Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu			
TGG AGT GAA AAC CTT TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC			
621	630	639	648
			657

Fig.1/2

125 Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu Lys Gln Asn Thr Val
 AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG GAG AAA CAG AAC ACC GTG
 666 675 684 693 702

130 135
 140 Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val
 TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC
 711 720 729 738 747

145 150
 155 Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Lys Cys
 TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC
 756 765 774 783 792

160 165
 170 Leu Pro Gln Ile Glu Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr
 CTA CCC CAG ATT GAG AAT GTT AAG GGC ACT GAG GAC TCA GGC ACC
 801 810 819 828 837

175 180
 185 Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe Gly Leu Cys Leu Leu
 ACA GTG CTG TTG CCC CTG GTC ATT TTC TTT GGT CTT TGC CTT TTA
 846 855 864 873 882

190 195
 200 Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 TCC CTC CTC TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG
 891 900 909 918 927

205 210
 215 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys
 TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA CCT GAA AAA
 936 945 954 963 972

220 225
 230 Glu Gly Glu Leu Glu Gly Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn
 GAG GGG GAG CTT GAA GGA ACT ACT ACT AAG CCC CTG GCC CCA AAC
 981 990 999 1008 1017

240 245
 250 Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr Pro Thr Leu Gly Phe
 CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC TTC ACC CCC ACC CTG GGC TTC
 1026 1035 1044 1053 1062

255 260
 265 Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr
 AGT CCC GTG CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC
 1071 1080 1089 1098 1107

270 275
 280 Pro Gly Asp Cys Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala
 CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA GAG GTG GCA
 1116 1125 1134 1143 1152

Fig.1/3

Pro	Pro	Tyr	Gln	Gly	Ala	Asp	Pro	Ile	Leu	Ala	Thr	Ala	Leu	Ala
CCA	CCC	TAT	CAG	GGG	GCT	GAC	CCC	ATC	CTT	GCG	ACA	GCC	CTC	GCC
1161			1170			1179			1188			1197		
			290					295					300	
Ser	Asp	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Gln	Lys	Trp	Glu	Asp	Ser	Ala
TCC	GAC	CCC	ATC	CCC	AAC	CCC	CTT	CAG	AAG	TGG	GAG	GAC	AGC	GCC
1206			1215			1224			1233			1242		
			305					310					315	
His	Lys	Pro	Gln	Ser	Leu	Asp	Thr	Asp	Asp	Pro	Ala	Thr	Leu	Tyr
CAC	AAG	CCA	CAG	AGC	CTA	GAC	ACT	GAT	GAC	CCC	GCG	ACG	CTG	TAC
1251			1260			1269			1278			1287		
			320					325					330	
Ala	Val	Val	Glu	Asn	Val	Pro	Pro	Leu	Arg	Trp				
GCC	GTG	GTG	GAG	AAC	GTG	CCC	CCG	TTG	CGC	TGG	AA	<u>GGAATTC</u>		
1296			1305			1314			1323			1332		
			335					340						

0251

Fig.2

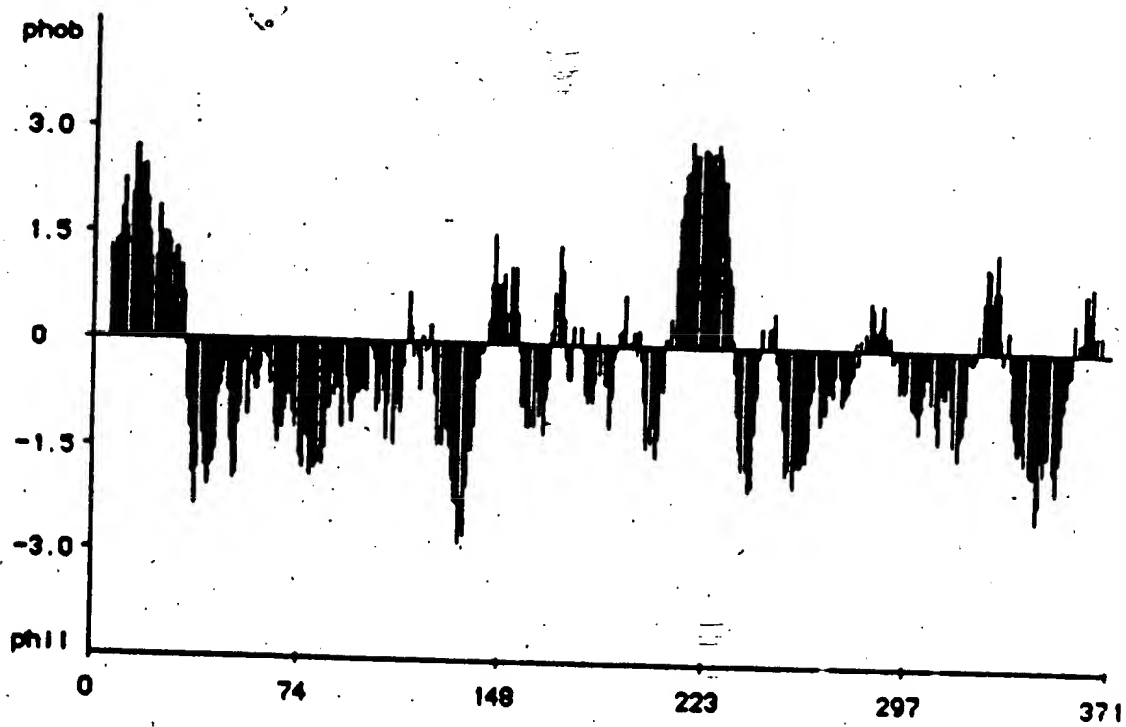
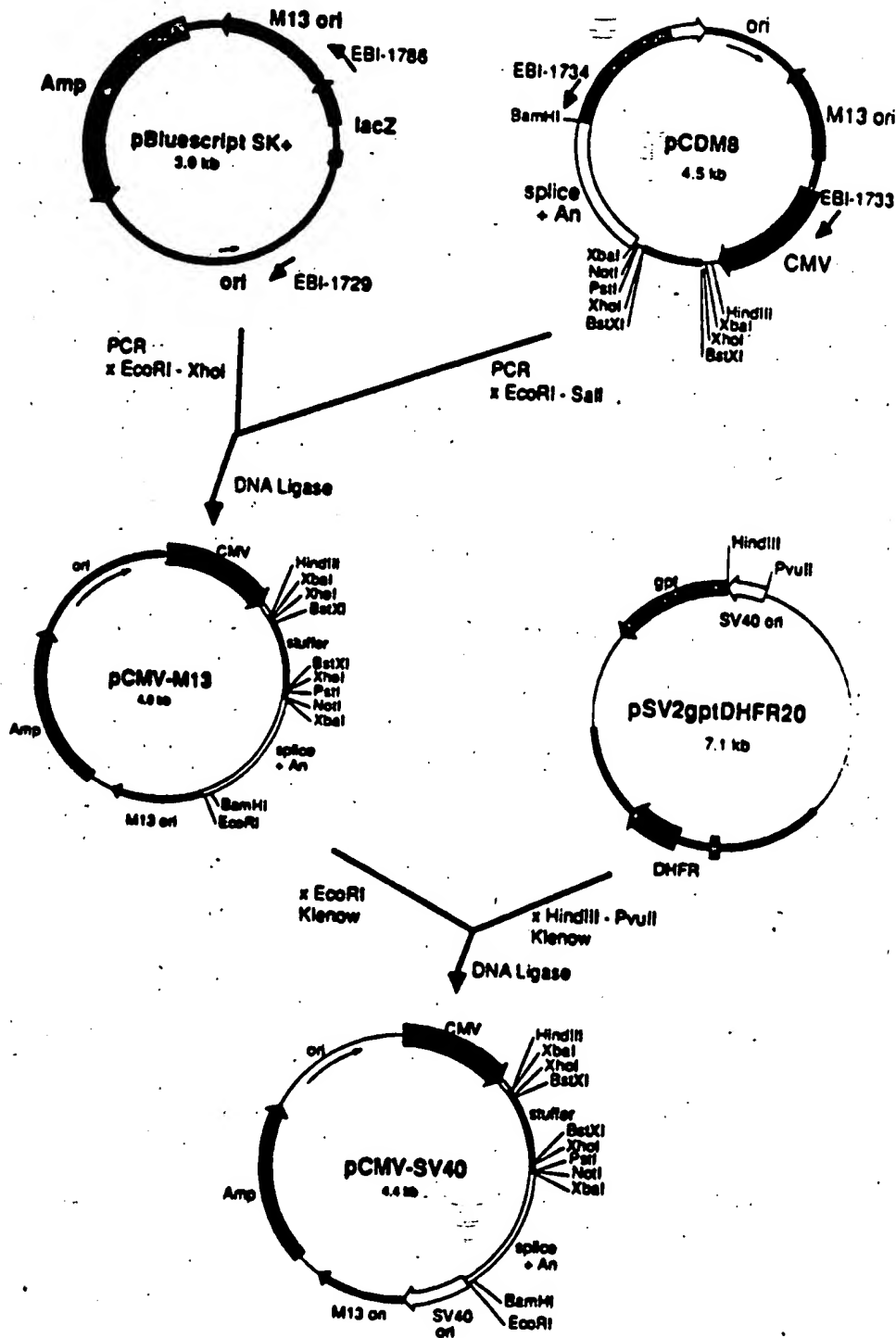


Fig.3



1p

0

2

5

1

Fig. 4

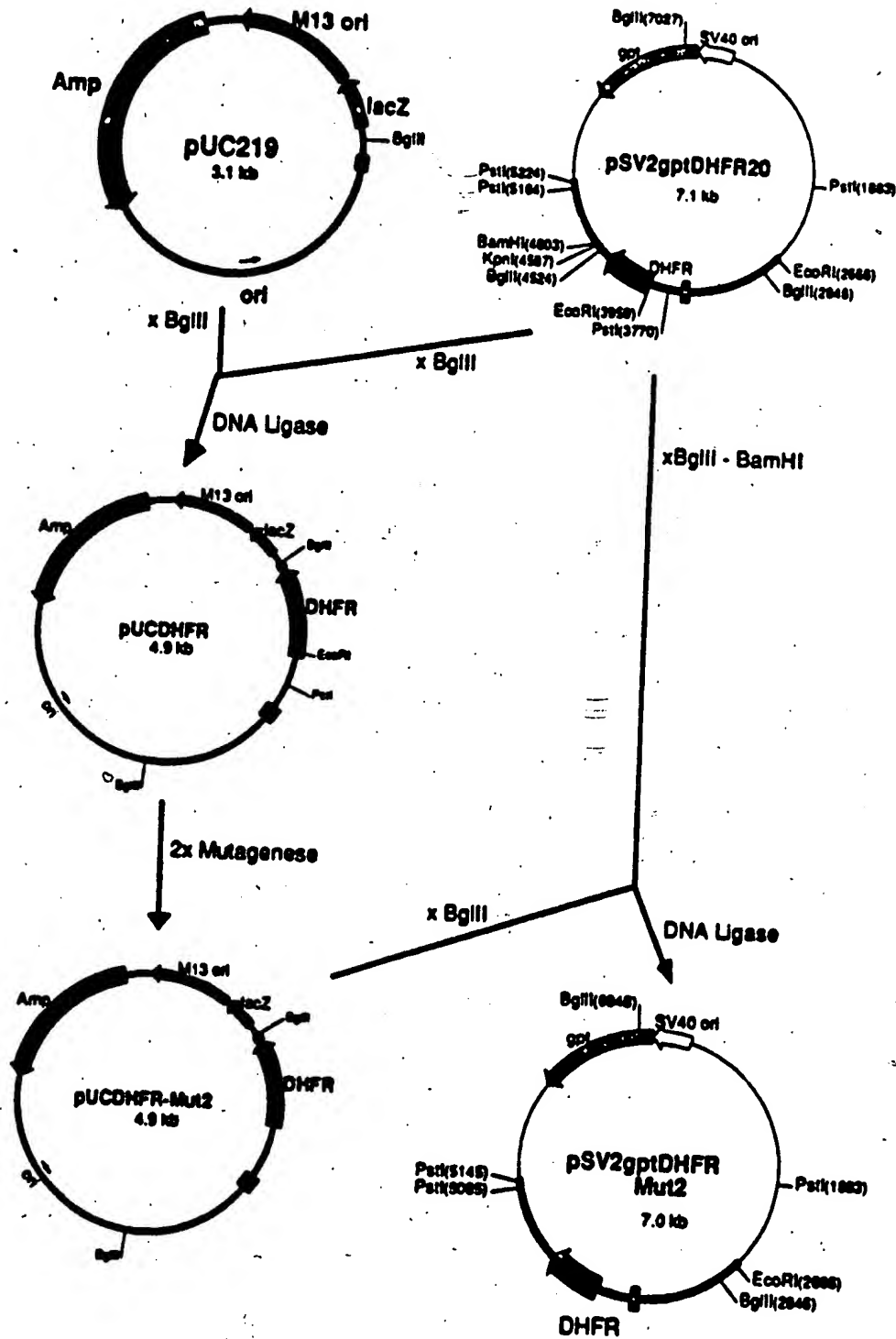


Fig.5

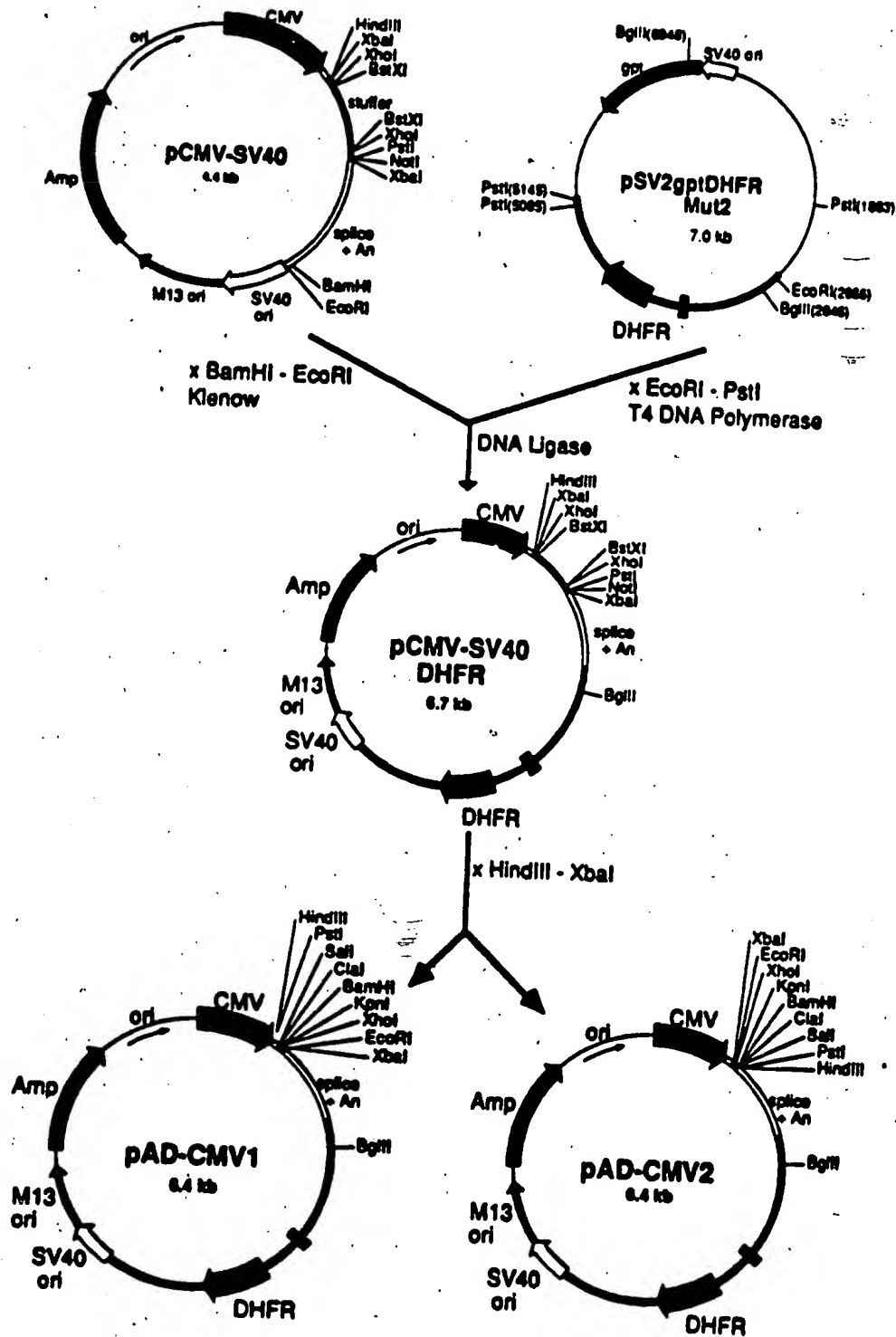


Fig.6/1

pAD-CMV1 : 6414 bp

TCGACATTGA TTATTGACTA GTTATTAATA GTAATCAATT ACGGGGTCAT TAGTTCATAG	60
CCCATATATG GAGTTCCGCG TTACATAACT TACGGTAAAT GGCCCGCTG GCTGACCGCC	120
CAACGACCCC CGCCCATTGA CGTCAATAAT GACGTATGTT CCCATAGTAA CGCCAATAGG	180
GCTTTCCAT TGACGTCAAT GGGTGGAGTA TTTACGGTAA ACTGCCCACT TGGCAGTACA	240
TCAAGTGTAT CATATGCCAA GTACGCCCCC TATTGACGTC AATGACGGTA AATGGCCCCG	300
CTGGCATTAT GCCCAGTACA TGACCTTATG GGACTTTCCT ACTGGCAGT ACATCTACGT	360
ATTAGTCATC GCTATTACCA TGGTGATGCG GTTTTGGCAG TACATCAATG GGCGTGGATA	420
GCGGTTTGAC TCACGGGGAT TTCCAAGTCT CCACCCCACT GACGTCAATG GGAGTTTGTT	480
TTGGCACCAA AATCAACGGG ACTTTCCAAA ATGTCGTAAC AACTCCGCC CATTGACGCA	540
AATGGGCGGT AGGCGTGAC GGTGGGAGGT CTATATAAGC AGAGCTCTCT GGCTAACTAG	600
AGAACCCACT GCTTAACTGG CTTATCGAAA TTAATACGAC TCACTATAGG GAGACCCAAG	660
CTTCTGCAGG TCGACATCGA TGGATCCGGT ACCTCGAGCG CGAATTCTCT AGAGGATCTT	720
TGTGAAGGAA CCTTACTTCT GTGGTGTGAC ATAATTGGAC AACTACCTA CAGAGATTTA	780
AAGCTCTAAG GTAAATATAA AATTTTAAAG TGTATAATGT GTTAACTAC TGATTCTAAT	840
TGTTTGTGTA TTTTAGATTC CAACCTATGG AACTGATGAA TGGGAGCAGT GGTGGAATGC	900
CTTTAATGAG GAAAACCTGT TTTGCTCAGA AGAAATGCCA TCTAGTGATG ATGAGGCTAC	960
TGCTGACTCT CAACATTCTA CTCCTCCAAA AAAGAAGAGA AAGGTAGAAG ACCCCAAGGA	1020
CTTTCCTTCA GAATTGCTAA GTTTTTTGAG TCATGCTGTG TTAGTAATA GAACTCTTGC	1080
TTGCTTTGCT ATTTACACCA CAAAGGAAAA AGCTGCACTG CTATACAAGA AAATTATGGA	1140
AAAATATTG ATGTATAGTG CCTTGACTAG AGATCATAAT CAGCCATACC ACATTTGTAG	1200
AGGTTTACT TGCTTTAAAA AACCTCCCAC ACCTCCCCCT GAACCTGAAA CATAAAATGA	1260
ATGCAATTGT TGTGTGTAAC TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA	1320
GCATCACAAA TTTCACAAAT AAAGCATTTC TTCACTGCA TTCTAGTTGT GGTGTTGCCA	1380
AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGGA TCAATTCTGA GAACTAGCC TTAAAGACAG	1440
ACAGCTTTGT TCTAGTCAGC CAGGCAAGCA TATGTAAATA AAGTTCCTCA GGGAACTGAG	1500
GTAAAGAT GTATCCTGGA CCTGCCAGAC CTGGCCATTC ACGTAAACAG AAGATTCCGC	1560
CTCAAGTTCC GGTAAACAAC AGGAGGCAAC GAGATCTCAA ATCTATTACT TCTAATCGGG	1620
TAATTAAAC CTTTCAACTA AAACACGGAC CCACGGATGT CACCCACTTT TCCTTCCCCG	1680
GCTCCGCCCT TCTCAGTACT CCCCACTT AGGCTCGCTA CTCCACCTCC ACTTCCGGGC	1740

Fig.6/2

GCGACACCCA CGTGCCCTCT CCCACCCGAC GCTAACCCCG CCCCTGCCCG TCTGACCCCG	1800
CCCACCACCT GGCCCCGCCC CGTTGAGGAC AGAAGAAACC CCGGGCAGCC GCAGCCAAGG	1860
CGGACGGGTA GACGCTGGGG GCGCTGAGGA GTCGTCTCT ACCTTCTCTG CTGGCTCGGT	1920
UGGGGACGCG GTGGATCTCA GGCTTCCGGA AGACTGGAAG AACCGGCTCA GAACCGCTTG	1980
TCTCCGCGGG GCTTGGGCGG CGGAAGAATG GCCGCTAGAC GCGGACTTGG TGCGAGGCAT	2040
CGCAGGATGC AGAAGAGCAA GCGCGCCGGG AGCGCGCGGC TGTACTACCC CGCGCCTGGA	2100
GCGGCCACGC CGGACTGGGC GGGGCCGGCC TGGTGGAGGC GGAGTCTGAC CTCGTGGAGG	2160
CGGGGCCTCT GATGTTCAA TAGGATGCTA GGCTTGTTGA GCGTGGCCT CCGATTACA	2220
AGTGGGAAGC AGCGCCGGGC GACTGCAATT TCGCGCCAAA CTTGGGGGAA GCACAGCGTA	2280
CAGGCTGCCT AGGTGATCGC TGCTGCTGTC ATGTTTCGAC CGCTGAAC TG CATCGTCGCC	2340
GTGTCCCAGA ATATGGGCAT CGGCAAGAAC GGAGACCTTC CCTGGCCAAT GCTCAGGTAC	2400
TGGCTGGATT GGGTTAGGGA AACCGAGGCG GTTCGCTGAA TCGGGTCGAG CACTTGGCGG	2460
AGACGCGCGG GCCAACTACT TAGGGACAGT CATGAGGGGT AGGCCCGCCG GCTGCTGCCC	2520
TTGCCCATGC CCGCGGTGAT CCCCATGCTG TGCCAGCCTT TGCCAGAGG CGCTCTAGCT	2580
GGGAGCAAAG TCCGGTCACT GGGCAGCACC ACCCCCCGGA CTTGCATGGG TAGCCGCTGA	2640
GATGGAGCCT GAGCACACGT GACAGGGTCC CTGTTAACGC AGTGTTTCTC TAACTTTCAG	2700
GAACGAGTTC AAGTACTTCC AAAGAATGAC CACCACCTCC TCAGTGAAG GTAAACAGAA	2760
CCTGGTGATT ATGGGCCGGA AAACCTGGTT CTCCATTCTT GAGAAGAATC GACCTTTAAA	2820
GGACAGAAAT AATATAGTTC TCAGTAGAGA GCTCAAGGAA CCACCACAAG GAGCTCATTT	2880
TCTTGCCAAA AGTCTGGACC ATGCCTTAAA ACTTATTGAA CAACCAGAGT TAGCAGATAA	2940
AGTGGACATG GTTTGGATAG TTGGAGGCAG TTCCGTTTAC AAGGAAGCCA TGAATCAGCC	3000
AGGCCATCTC AGACTCTTTG TGACAAGGAT CATGCAGGAA TTTGAAAGTG ACACGTTCTT	3060
CCCAGAAAT GATTTGGAGA AATATAAACT TCTCCAGAG TACCCAGGGG TCCTTTCTGA	3120
AGTCCAGGAG GAAAAAGGCA TCAAGTATAA ATTTGAAGTC TATGAGAAGA AAGGCTAACA	3180
GAAAGATACT TGCTGATTGA CTTCAAGTTC TACTGCTTTC CTCCTAAAAT TATGCATTTT	3240
TACAAGACCA TGGGACTTGT GTTGGCTTTA GATCCTGTGC ATCCTGGGCA ACTGTTGTAC	3300
TCTAAGCCAC TCCCCAAAGT CATGCCCCAG CCCCTGTATA ATTCTAAACA ATTAGAATTA	3360
TTTTCATTTT CATTAGTCTA ACCAGGTTAT ATTAAATATA CTTTAAGAAA CACCATTTCG	3420
CATAAAGTTC TCAATGCCCC TCCCATGCAG CCTCAAGTGG CTCCCCAGCA GATGCATAGG	3480
GTAGTGTGTG TACAAGAGAC CCCAAAGACA TAGAGCCCCT GAGAGCATGA GCTGATATGG	3540

Fig.6/3

GGGCTCATAG AGATAGGAGC TAGATGAATA AGTACAAAGG GCAGAAATGG GTTTTAACCA	3600
GCAGAGCTAG AACTCAGACT TTAAGAAAA TTAGATCAAA GTAGAGACTG AATTATTCTG	3660
CACATCAGAC TCTGAGCAGA GTTCTGTTCA CTCAGACAGA AAATGGGTAA ATTGAGAGCT	3720
GGCTCCATTG TGCTCCTTAG AGATGGGAGC AGGTGGAGGA TTATATAAGG TCTGGAACAT	3780
TTAACTTCTC CGTTTCTCAT CTTCACTGAG ATTCCAAGGG ATACTACAAT TCTGTGGAAT	3840
GTGTGTCAGT TAGGGTGTGG AAAATCCCCA GGCTCCCCAG CAGGCAGAAG TATGCAAAGC	3900
ATGCATCTCA ATTAGTCAGC AACCAGGTGT GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA	3960
AGTATGCAAA GCATGCATCT CAATTAGTCA GCAACCATAG TCCCGCCCCC AACTCCGCCC	4020
ATCCCGCCCC TAACTCCGCC CAGTTCGCC CATCTCCGC CCCATGGCTG ACTAATTTTT	4080
TTTATTTATG CAGAGGCCGA GGCGCCTCTG AGCTATTCCA GAAGTAGTGA GGAGGCTTTT	4140
TTGGAGGCCT AGGCTTTTGC AAAAAGCTA ATTCAGCCTG AATGGCGAAT GGGACGCGCC	4200
CTGTAGCGGC GCATTAAGCG CGGCGGTGT GGTGGTTACG CGCAGCGTGA CCGCTACACT	4260
TGCCAGCGCC CTAGCGCCCG CTCCTTTCGC TTTCTTCCCT TCCTTTCTCG CCACGTTCCG	4320
CGGCTTTCCC CGTCAAGCTC TAAATCGGGG GCTCCCTTTA GGGTTCGGAT TTAGTGCTTT	4380
ACGGCACCTC GACCCCAAAA ACTTGATTAG GGTGATGGT CACGTAGTGG GCCATCGCCC	4440
TGATAGACGG TTTTTCGCCC TTGACGTTG GAGTCCACGT TCTTTAATAG TGGACTCTTG	4500
TTCCAACTG GAACAACACT CAACCTATC TCGGTCTATT CTTTGATTT ATAAGGGATT	4560
TTGCCGATTT CGGCCTATTG GTTAAAAAT GAGCTGATTT AACAAAAATT TAACGCGAAT	4620
TTTAACAAAA TATTAACGTT TACAATTTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA	4680
ACCCCTATTT GTTTATTTTT CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA	4740
CCCTGATAAA TGCTTCAATA ATATTGAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT	4800
GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT TCGGCATTT TGCCTTCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG	4860
CTGGTGAAAG TAAAAGATGC TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG	4920
GATCTCAACA GCGGTAAGAT CCTTGAGAGT TTTGCCCCG AAGAAGCTTT TCCAATGATG	4980
AGCACTTTTA AAGTTCTGCT ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG	5040
CAACTCGGTC GCCGCATACA CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA	5100
GAAAAGCATC TTACGGATGG CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG	5160
AGTGATAACA CTGCGGCCAA CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC	5220
GCTTTTTTGC ACAACATGGG GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG	5280
AATGAAGCCA TACCAAACGA CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG	5340

Fig.6/4

TTGCGCAAC TATTAAGTGG CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC	5400
TGGATGGAGG CGGATAAAGT TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GUCTGGCTGG	5460
TTTATTGCTG ATAAATCTGG AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG	5520
GGGCCAGATG GTAAGCCCTC CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT	5580
ATGCATGAAC GAAATAGACA GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA	5640
CTGTCAGACC AAGTTTACTC ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTAAATT	5700
AAAAGGATCT AGGTGAAGAT CCTTTTGTAT AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG	5760
TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT	5820
TTTTTCTGCG GCGTAATCTG CTGCTTGCAA AAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT	5880
TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT ACCAACTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG	5940
CAGATACCAA ATACTGTCCT TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT	6000
GTAGCACCGC CTACATACCT CGCTCTGCTA ATCTGTGTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC	6060
GATAAGTCGT GTCTTACCGG GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG	6120
TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA	6180
CTGAGATACC TACAGCGTGA GCATTGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG	6240
GACAGGTATC CGGTAAGCGG CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG	6300
GGAAACGCCT GGTATCTTTA TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA	6360
TTTTTGTGAT GCTCGTCAGG GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCC	

0

2

5

1

Fig.7A

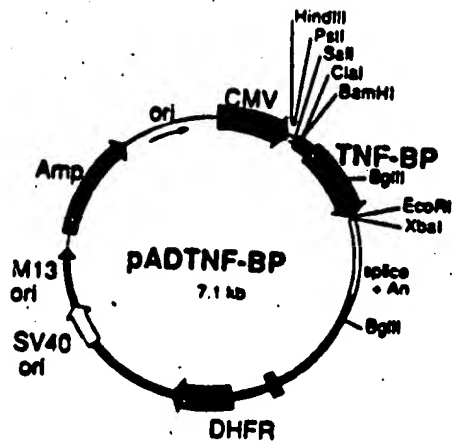


Fig.7B

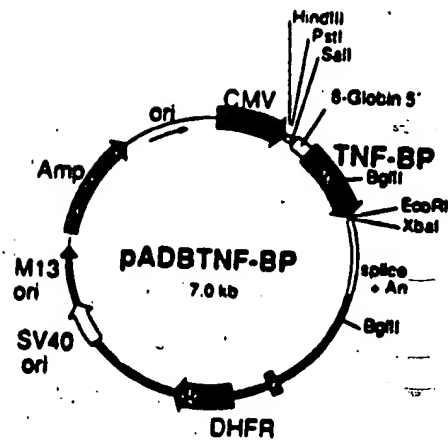


Fig.7C

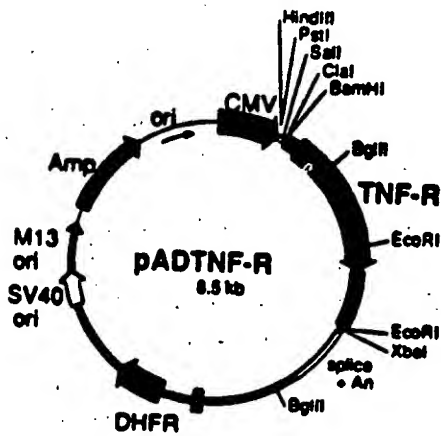


Fig.7D

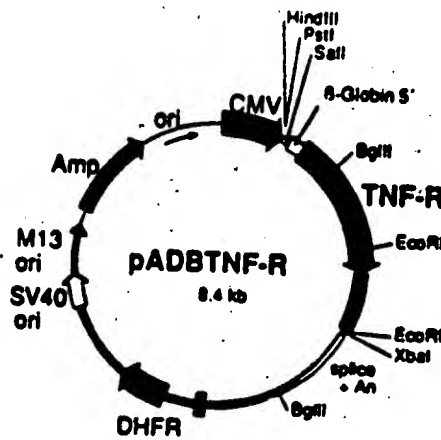


Fig.8/1

EATNF-R

GAATTCCTTT TCTCCGAGTT TTCTGAACTC TGGCTCATGA TCGGGGTTAC TGGATACGAG 60
 AATCCTGGAG, GACCGTACCC TGATTTCAT CTACCTCTGA CTTTGAGCCT TTCTAACCCG 120
 GGGCTCACGC TGCCAACACC CGGGCCACCT GGTCCGATCG TCTTACTTCA TTCACCAGCG 180
 ITGCCAATTG CTGCCCTGTC CCCAGCCCCA ATGGGGGAGT GAGAGAGGCC ACTGCCGGCC 240
 GGAC
 245/1 275/11
 ATG GGT CTC CCC ATC GTG CCT GGC CTG CTG CTG TCA CTG GTG CTC CTG GCT CTG CTG ATG
 Met Gly Leu Pro Ile Val Pro Gly Leu Leu Leu Ser Leu Val Leu Leu Ala Leu Leu Met
 305/21 335/31
 GGG ATA CAC CCA TCA GGG GTC ACC GGA CTG GTT CCT TCT CTT GGT GAC CGG GAG AAG AGG
 Gly Ile His Pro Ser Gly Val Thr Gly Leu Val Pro Ser Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg
 365/41 395/51
 GAT AAT TTG TGT CCC CAG GGA AAG TAT GCC CAT CCA AAG AAT AAT TCC ATC TGC TGC ACC
 Asp Asn Leu Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ala His Pro Lys Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr
 425/61 455/71
 AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG GTG AGT GAC TGT CCA AGC CCA GGG CAG GAA ACA GTC
 Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Val Ser Asp Cys Pro Ser Pro Gly Gln Glu Thr Val
 485/81 515/91
 TGC GAG CTC TCT CAT AAA GGC ACC TTT ACA GCT TCG CAG AAC CAC GTC AGA CAG TGT CTC
 Cys Glu Leu Ser His Lys Gly Thr Phe Thr Ala Ser Gln Asn His Val Arg Gln Cys Leu
 545/101 575/111
 AGT TGC AAG ACA TGT CGG AAA GAA ATG TTC CAG GTG GAG ATT TCT CCT TGC AAA GCT GAC
 Ser Cys Lys Thr Cys Arg Lys Glu Met Phe Gln Val Glu Ile Ser Pro Cys Lys Ala Asp
 605/121 635/131
 ATG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AAG AAG AAC CAA TTC CAG CGC TAC CTG AGT GAG ACG CAT
 Met Asp Thr Val Cys Gly Cys Lys Lys Asn Gln Phe Gln Arg Tyr Leu Ser Glu Thr His
 665/141 695/151
 TTC CAG TGT GTG GAC TGC AGC CCC TGC TTC AAT GGC ACC GTG ACA ATC CCC TGT AAG GAG
 Phe Gln Cys Val Asp Cys Ser Pro Cys Phe Asn Gly Thr Val Thr Ile Pro Cys Lys Glu
 725/161 755/171
 AAA CAG AAC ACC GTG TGT AAC TGC CAC GCA GGA TTC TTT CTA AGC GGA AAT GAG TGC ACC
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Asn Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Ser Gly Asn Glu Cys Thr
 785/181 815/191
 CCT TGC AGC CAC TGC AAG AAA AAT CAG GAA TGT ATG AAG CTG TGC CTA CCT CCA GTT GCA
 Pro Cys Ser His Cys Lys Lys Asn Gln Glu Cys Met Lys Leu Cys Leu Pro Pro Val Ala
 845/201 875/211
 AAT GTC ACA AAC CCC CAG GAC TCA GGT ACT GCC GTG CTG TTG CCT CTG GTT ATC TTC CTA
 Asn Val Thr Asn Pro Gln Asp Ser Gly Thr Ala Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Leu
 905/221 935/231
 GGT CTT TGC CTT TTA TTC TTT ATC TGC ATC AGT CTA CTG TGC CGA TAT CCC CAG TGG AGG
 Gly Leu Cys Leu Leu Phe Phe Ile Cys Ile Ser Leu Leu Cys Arg Tyr Pro Gln Trp Arg
 965/241 995/251
 CCC AGG GTC TAC TCC ATC ATT TGT AGG GAT TCA GCT CCT GTC AAA GAG GTG GAG GGT GAA
 Pro Arg Val Tyr Ser Ile Ile Cys Arg Asp Ser Ala Pro Val Lys Glu Val Glu Gly Glu
 1025/261 1055/271
 GGA ATT GTT ACT AAG CCC CTA ACT CCA GCC TCT ATC CCA GCC TTC AGC CCC AAC CCC GGC
 Gly Ile Val Thr Lys Pro Leu Thr Pro Ala Ser Ile Pro Ala Phe Ser Pro Asn Pro Gly
 1085/281 1115/291
 TTC AAC CCC ACT CTG GGC TTC AGC ACC ACC CCA CGC TTC AGT CAT CCT GTC TCC AGT ACC
 Phe Asn Pro Thr Leu Gly Phe Ser Thr Thr Pro Arg Phe Ser His Pro Val Ser Ser Thr
 1145/301 1175/311
 CCC ATC AGC CCC GTC TTC GGT CCT AGT AAC TGG CAC AAC TTC GTG CCA CCT GTA AGA GAG
 Pro Ile Ser Pro Val Phe Gly Pro Ser Asn Trp His Asn Phe Val Pro Pro Val Arg Glu
 1205/321 1235/331
 GTG GTC CCA ACC CAG GGT GCT GAC CCT CTC CTC TAC GGA TCC CTC AAC CCT GTG CCA ATC
 Val Val Pro Thr Gln Gly Ala Asp Pro Leu Leu Tyr Gly Ser Leu Asn Pro Val Pro Ile
 1265/341 1295/351
 CCC GCC CCT GTT CGG AAA TGG GAA GAC GTC GTC GCG GCC CAG CCA CAA CGG CTT GAC ACT

Fig.8/2

Pro Ala Pro Val Arg Lys Trp Glu Asp Val Val Ala Ala Gln Pro Gln Arg Leu Asp Thr
 1325/361 1355/371
 GCA GAC CCT GCG ATG CTG TAT GCT GTG GTG GAT GGC GTG CCT CCG ACA CGC TGG AAG GAG
 Al. Asp Pro Ala Met Leu Tyr Ala Val Val Asp Gly Val Pro Pro Thr Arg Trp Lys Glu
 1385/381 1415/391
 TTC ATG CGG CTC CTG GGG CTG AGC GAG CAC GAG ATC GAG CGG CTG GAG CTG CAG AAC GGG
 Phe Met Arg Leu Leu Gly Leu Ser Glu His Glu Ile Glu Arg Leu Glu Leu Gln Asn Gly
 1445/401 1475/411
 CGT TGC CTC CGC GAG GCT CAT TAC AGC ATG CTG GAA GCC TGG CGG CGC CGC ACA CCG CGA
 Arg Cys Leu Arg Glu Ala His Tyr Ser Met Leu Glu Ala Trp Arg Arg Arg Thr Pro Arg
 1505/421 1535/431
 CAC GAG GCC ACG CTG GAC GTA GTG GGC CGC GTG CTT TGC GAC ATG AAC CTG CGT GGC TGC
 His Glu Ala Thr Leu Asp Val Val Gly Arg Val Leu Cys Asp Met Asn Leu Arg Gly Cys
 1565/441 1595/451
 CTG GAG AAC ATC CGC GAG ACT CTA GAA AGC CCT GCC CAC TCG TCC ACG ACC CAC CTC CCG
 Leu Glu Asn Ile Arg Glu Thr Leu Glu Ser Pro Ala His Ser Ser Thr Thr His Leu Pro
 1625/461
 CGA TAA
 Arg Stop

GGCCACACCC	CCACCTCAGG	AACGGGACTC	GAAGGACCAT	CCTGCTAGAT	1680
GCCCTGCTTC	CCTGTGAACC	TCCTCTTTGG	TCCTCTAGGG	GGCAGGCTCG	1740
CTCGATCTGG	CAGCCACTTC	CTTGGTGCTA	CCGACTTGGT	GTACATAGCT	1800
GCCGAGGACA	GCCTGTGCCA	GCCACTTGTG	CATGGCAGGG	AAGTGTGCCA	1860
GACAGCTGAG	GGTGCCAAAA	GCCAGGAGAG	GTGATTGTGG	AGAAAAAGCA	1920
GATACCCACT	TGGGATGCAA	GGACCCAAAC	AAAGCTTCTC	AGGGCCTCCT	1980
CTGGGCCCTT	TTCACAGTAG	ATAAAACAGT	CTTTGTATTG	ATTATATCAC	2040
GAACGGITGA	ACTCCCTAAG	GTAGGGGCAA	GCACAGAACA	GTGGGGTCTC	2100
CCCCGACTCT	TGTAAATACA	CTAAAAATCT	AAAAGTGAAA	AAAAAAAAAA	2160
AAAAAAGGAA	TTC				

Fig.9/1

huTNE-R

GAATTCTCTG GACTGAGGCT CCAGTTCTGG CCTTTGGGGT TCAAGATCAC TGGGACCAGG 60
 CCGTGATCTC TATGCCCCGAG TCTCAACCCT CAACTGTAC CCAAGGCAC TTGGGACGTC 120
 CTGGACAGAC CGAGTCCCGG GAAGCCCCAG CACTGCCGCT GCCACACTGC CCTGAGCCCA 180
 AATGGGGJAG TGAGAGGCCA TAGCTGTCTG GC

213/1 243/11
 ATG GGC CTC TCC ACC GTG CCT GAC CTG CTG CTG CCA CTG GTG CTC CTG GAG CTG TTG GTG
 Met Gly Leu Ser Thr Val Pro Asp Leu Leu Leu Pro Leu Val Leu Leu Glu Leu Leu Val
 273/21 303/31
 GGA ATA TAC CCC TCA GGG GTT ATT GGA CTG GTC CCT CAC CTA GGG GAC AGG GAG AAG AGA
 Gly Ile Tyr Pro Ser Gly Val Ile Gly Leu Val Pro His Leu Gly Asp Arg Glu Lys Arg
 333/41 363/51
 GAT AGT GTG TGT CCC CAA GGA AAA TAT ATC CAC CCT CAA AAT AAT TCG ATT TGC TGT ACC
 Asp Ser Val Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr
 393/61 423/71
 AAG TGC CAC AAA GGA ACC TAC TTG TAC AAT GAC TGT CCA GGC CCG GGG CAG GAT ACG GAC
 Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp
 453/81 483/91
 TGC AGG GAG TGT GAG AGC GGC TCC TTC ACC GCT TCA GAA AAC CAC CTC AGA CAC TGC CTC
 Cys Arg Glu Cys Glu Ser Gly Ser Phe Thr Ala Ser Glu Asn His Leu Arg His Cys Leu
 513/101 543/111
 AGC TGC TCC AAA TGC CGA AAG GAA ATG GGT CAG GTG GAG ATC TCT TCT TGC ACA GTG GAC
 Ser Cys Ser Lys Cys Arg Lys Glu Met Gly Gln Val Glu Ile Ser Ser Cys Thr Val Asp
 573/121 603/131
 CGG GAC ACC GTG TGT GGC TGC AGG AAG AAC CAG TAC CGG CAT TAT TGG AGT GAA AAC CTT
 Arg Asp Thr Val Cys Gly Cys Arg Lys Asn Gln Tyr Arg His Tyr Trp Ser Glu Asn Leu
 633/141 663/151
 TTC CAG TGC TTC AAT TGC AGC CTC TGC CTC AAT GGG ACC GTG CAC CTC TCC TGC CAG GAG
 Phe Gln Cys Phe Asn Cys Ser Leu Cys Leu Asn Gly Thr Val His Leu Ser Cys Gln Glu
 693/161 723/171
 AAA CAG AAC ACC GTG TGC ACC TGC CAT GCA GGT TTC TTT CTA AGA GAA AAC GAG TGT GTC
 Lys Gln Asn Thr Val Cys Thr Cys His Ala Gly Phe Phe Leu Arg Glu Asn Glu Cys Val
 753/181 783/191
 TCC TGT AGT AAC TGT AAG AAA AGC CTG GAG TGC ACG AAG TTG TGC CTA CCC CAG ATT GAG
 Ser Cys Ser Asn Cys Lys Lys Ser Leu Glu Cys Thr Lys Leu Cys Leu Pro Gln Ile Glu
 813/201 843/211
 AAT GTT AAG GGC ACT GAG GAC TCA GGC ACC ACA GTG CTG TTG CCC CTG GTC ATT TTC TTT
 Asn Val Lys Gly Thr Glu Asp Ser Gly Thr Thr Val Leu Leu Pro Leu Val Ile Phe Phe
 873/221 903/231
 GGT CTT TGC CTT TTA TCC CTC CTC TTC ATT GGT TTA ATG TAT CGC TAC CAA CGG TGG AAG
 Gly Leu Cys Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile Gly Leu Met Tyr Arg Tyr Gln Arg Trp Lys
 933/241 963/251
 TCC AAG CTC TAC TCC ATT GTT TGT GGG AAA TCG ACA CCT GAA AAA GAG GGG GAG CTT GAA
 Ser Lys Leu Tyr Ser Ile Val Cys Gly Lys Ser Thr Pro Glu Lys Glu Gly Glu Leu Glu
 993/261 1023/271
 GGA ACT ACT ACT AAG CCC CTG GCC CCA AAC CCA AGC TTC AGT CCC ACT CCA GGC TTC ACC
 Gly Thr Thr Thr Lys Pro Leu Ala Pro Asn Pro Ser Phe Ser Pro Thr Pro Gly Phe Thr
 1053/281 1083/291
 CCC ACC CTG GGC TTC AGT CCC GTG CCC AGT TCC ACC TTC ACC TCC AGC TCC ACC TAT ACC
 Pro Thr Leu Gly Phe Ser Pro Val Pro Ser Ser Thr Phe Thr Ser Ser Ser Thr Tyr Thr
 1113/301 1143/311
 CCC GGT GAC TGT CCC AAC TTT GCG GCT CCC CGC AGA GAG GTG GCA CCA CCC TAT CAG GGG
 Pro Gly Asp Cys Pro Asn Phe Ala Ala Pro Arg Arg Glu Val Ala Pro Pro Tyr Gln Gly
 1173/321 1203/331
 GCT GAC CCC ATC CTT GCG ACA GCC CTC GCC TCC GAC CCC ATC CCC AAC CCC CTT CAG AAG
 Ala Asp Pro Ile Leu Ala Thr Ala Leu Ala Ser Asp Pro Ile Pro Asn Pro Leu Gln Lys

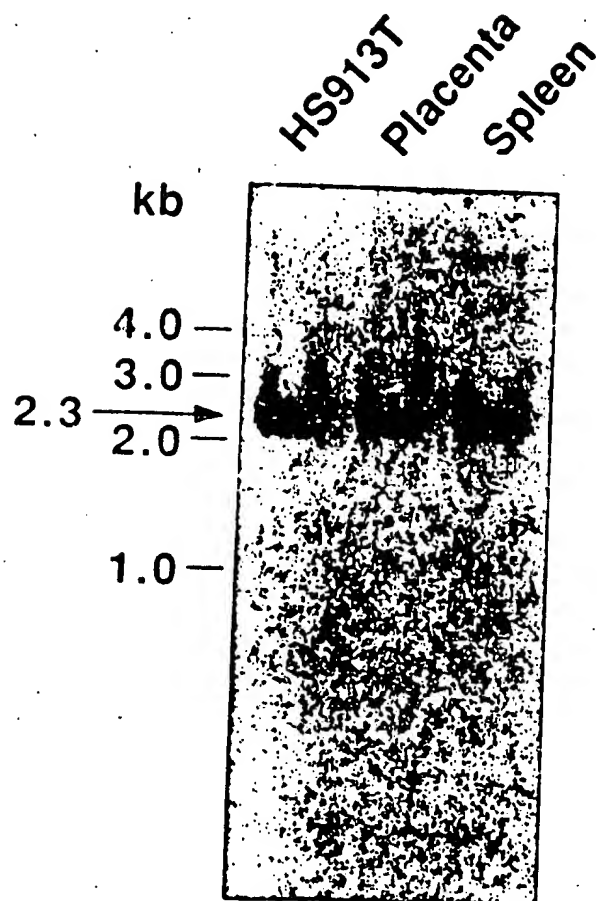
Fig. 9/2

1233/341
 TGG GAG GAC AGC GCC CAC AAG CCA CAG AGC
 Trp Glu Asp Ser Ala His Lys Pro Gln Ser
 1293/361
 GC GTG GTG GAG AAC GTG CCC CCG TTG CGC
 Ala Val Val Glu Asn Val Pro Pro Leu Arg
 1353/381
 AGC GAC CAC GAG ATC GAT CGG CTG GAG CTG
 Ser Asp His Glu Ile Asp Arg Leu Glu Leu
 1413/401
 TAC AGC ATG CTG GCG ACC TGG AGG CGG CGC
 Tyr Ser Met Leu Ala Thr Trp Arg Arg Arg
 1473/421
 CTG GGA CGC GTG CTC CGC GAC ATG GAC CTG
 Leu Gly Arg Val Leu Arg Asp Met Asp Leu
 1533/441
 CTT TGC GGC CCC GCC GCC CTC CCG CCC GCG
 Leu Cys Gly Pro Ala Ala Leu Pro Pro Ala Pro Ser Leu Arg Stop

1263/351
 CTA GAC ACT GAT GAC CCC CGC ACC CTG TAC
 Leu Asp Thr Asp Asp Pro Ala Thr Leu Tyr
 1323/371
 TGG AAG GAA TTC GTG CGG CGC CTA GGG CTG
 Trp Lys Glu Phe Val Arg Arg Leu Gly Leu
 1383/391
 CAG AAC GGG CGC TGC CTG CGC GAG GCG CAA
 Gln Asn Gly Arg Cys Leu Arg Glu Ala Gln
 1443/411
 ACG CCG CGG CGC GAG GCC ACG CTG GAG CTG
 Thr Pro Arg Arg Glu Ala Thr Leu Glu Leu
 1503/431
 CTG GGC TGC CTG GAG GAC ATC GAG GAG GCG
 Leu Gly Cys Leu Glu Asp Ile Glu Glu Ala
 1563/451
 CCC AGT CTT CTC AGA TGA
 Pro Ser Leu Leu Arg Stop

1580
 GGCTGCGCCC CTGCGGGCAG CTCTAAGGAC CGTCCTGCGA 1620
 GATCGCCCTC CAACCCCACT TTTTCTGGA AAGGAGGGGT CCTGCAGGGG CAAGCAGGAG 1680
 CTAGCAGCCG CCTACTTGGT GCTAACCCTT CGATGTACAT AGCTTTTCTC AGCTGCCTGC 1740
 GCGCCGCCGA CAGTCAGCGC TGTGCGCGCG GAGAGAGGTG CGCCGTGGGC TCAAGAGCCT 1800
 GAGTGGGTGG TTTGCGAGGA TGAGGGACGC TATGCCTCAT GCCCGTTTTG GGTGTCTCA 1860
 CCAGCAAGGC TGCTCGGGGG CCCCTGGTTC GTCCCTGAGC CTTTTTCACA GTGCATAAGC 1920
 AGTTTTTTTT GTTTTTGTTT TGTTTTGTTC TGTTTTTAAA TCAATCATGT TACACTAATA 1980
 GAAACTTGGC ACTCCTGTGC CCTCTGCCTG GACAAGCACA TAGCAAGCTG AACTGTCCTA 2040
 AGGCAGGGGC GAGCACGGAA CAATGGGGCC TTCAGCTGGA GCTGTGGACT TTTGTACATA 2100
 CACTAAAATT CTGAAGTTAA AAAAAAAAAA AAAAGGAATT C 2141

Fig.10



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☒ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.